



**ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ, ΤΟΜΕΑΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**Μελέτη του μηχανισμού καταστολής του μονοπατιού  
σηματοδότησης του TGF- $\beta$  από την λανθάνουσα  
μεμβρανική πρωτεΐνη 1 (LMP1) του ιού Epstein-Barr**

**Διατριβή Μ.Δ.Ε.  
ΠΡΟΚΟΒΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

**Σεπτέμβριος 2000**

Η εκπόνηση αυτής της διατριβής έγινε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Επ. Καθηγητή Δ. Καρδάση , του τομέα Επιστημών Υγείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το χρονικό διάστημα 1999-2000.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ Δημήτρη Καρδάση, όχι μόνο για την ανάθεση της ενδιαφέρουσας αυτής μελέτης, αλλά και για τη συνεχή βοήθεια και καθημερινή καθοδήγηση που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Οι συμβουλές του και οι συζητήσεις μας, πάνω από όλα, μου δίδαξαν τον τρόπο ερευνητικής σκέψης, που θεωρώ ότι πολυτιμότερο μου προσέφερε η εργασία αυτή.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Β.Ι. Ζαννή για τις υποδείξεις, τις διορθώσεις του και την βοήθεια που μου παρείχε κατά την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Επιπλέον, ευχαριστώ ιδιαίτερα τους συνεργάτες, αλλά κυρίως φίλους, Βέτα Παπακώστα, Θάλεια Ρομπάκη, Αναστασία Ρούσσου, Christine Scou, Λίνα Βαρδούλη και Γιώργο Κουτσοδόνη, για τις συμβουλές και την συμπαράστασή τους. Στάθηκαν πλάϊ μου σε δύσκολες αλλά και ευχάριστες στιγμές, και δημιούργησαν ένα κλίμα τόσο ζεστό, που δε θα μπορούσα, παρά να τους εκφράσω την εκτίμησή μου και την φιλία μου.

Τους γονείς μου, Θανάση και Ντίνα, και τις αδελφές μου, Εύη και Τάνια, τους ευχαριστώ όχι μόνο για την ενίσχυση που μου προσέφεραν σε όλους τους τομείς, αλλά και για την κατανόηση που επέδειξαν στις ανάγκες και επιθυμίες μου. Στον σύντροφό μου Γιώργο, θα ήθελα να μεταφέρω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την υπομονή του και την καθημερινή συμπαράσταση και βοήθεια που, αμέριστα, μου προσφέρει. Ελπίζω να φανώ αντάξια της εμπιστοσύνης σας.

Προκόβα Βίκυ.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Περίληψη</b>	<b>1</b>
<b>Εισαγωγή</b>	<b>2</b>
Ο Epstein-Barr (EBV) ιός και η λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 1 (Latent Membrane Protein 1, LMP1)	2
Η LMP1 χρησιμοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης του NF-κΒ	3
Εικόνα 1	5
Εικόνα 2	6
Δομική και λειτουργική ανάλυση του μορίου της πρωτεΐνης LMP1	7
Η έκφραση της LMP1 αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση	10
Διαφορές μεταξύ της LMP1-και TNFR-επαγόμενης σηματοδότησης	10
Ανταγωνιστική δράση των μονοπατιών σηματοδότησης του TGF-β και της LMP1	11
Ανταγωνιστική δράση των μονοπατιών σηματοδότησης του TGF-β και του TNFα	12
Σύγκλιση και συνεργασία των TGF-β και NF-κΒ μονοπατιών	13
TGF-β επαγόμενη μετάδοση σήματος από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα, μέσω των Smad πρωτεϊνών	14
Οι τρεις κατηγορίες των Smad πρωτεϊνών	15
Εικόνα 3	16
Εικόνα 4	17
Λειτουργικές περιοχές των Smad πρωτεϊνών	18
Εικόνα 5	21
Λειτουργικές περιοχές των Smad πρωτεϊνών	22
Πυρηνικές λειτουργίες των Smad πρωτεϊνών	22
Σχέση των πρωτεϊνών Smad με στοιχεία του κυτταροσκελετού	26
Ο ρόλος των Smad πρωτεϊνών στη ογκοκαταστολή και την επούλωση πληγών	26

<b>Υλικά</b>	<b>27</b>
Κατασκευή πλασμιδίων	27
Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών, παροδικές επιμολύνσεις, δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης (β-gal assay), μέτρηση δραστικότητας λουσιφεράσης (Luciferase assay), μεταφορά πρωτεϊνών (Western blotting), ανοσοκατακρήμνιση (CoIp, pull down)	28
<b>Μέθοδοι</b>	<b>28</b>
Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel)	28
Απομόνωση τμημάτων DNA	29
Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction)	29
Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH10B της <i>E.coli</i> (transformation)	29
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (miniprep procedure - micro screening)	30
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale preparation)	30
Πλασμιδιακές κατασκευές (plasmid constructions)	30
Κυτταροκαλλιέργειες	32
Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections)	33
Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal	34
Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay)	34
Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης (Western Blot)	35
Καθαρισμός πρωτεϊνών που φέρουν τον επίτοπο GST, από κύτταρα <i>E.coli</i>	36
<i>In vitro</i> αλληλεπίδραση πρωτεϊνών (pull-down)	37
Ανοσο-συνκατακρήμνιση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών (Co-Immunoprecipitation)	37
Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων	

με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence)	38
<b>Αποτελέσματα</b>	<b>40</b>
Συναγωνισμός μεταξύ των μονοπατιών του TGF-β και της λανθάνουσας μεμβρανικής πρωτεΐνης 1 LMP1	40
Περιοχές της πρωτεΐνης LMP1 που απαιτούνται για την αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β	42
Εικόνα 6	43
Εικόνα 7	44
Εικόνα 8	45
Εικόνα 9	48
Εικόνα 10	49
Εικόνα 11	52
Εικόνα 12	53
Εικόνα 13	54
Αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β από τους μεταγωγείς της ενεργοποίησης του NF-κΒ που χρησιμοποιεί η LMP1 πρωτεΐνη	55
Εικόνα 14	58
Εικόνα 15	59
Εικόνα 16	60
Ο NF-κΒ αναστέλλει το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β	61
Εικόνα 17	64
Εικόνα 18	65
Εικόνα 19	66
Μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Smad3 και p65 <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i>	67
Εικόνα 20	68
Εικόνα 21	69

Επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών των μεταγωγέων του NF-κB στην μεταγραφική ενεργότητα των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4	70
Επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών των μεταγωγέων ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κB στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β	71
Εικόνα 22	73
Εικόνα 23	74
Δομική και λειτουργική ανάλυση της πρωτεΐνης Smad3	75
Εικόνα 24	76
Εικόνα 25	78
Εικόνα 26	79
Ανάλυση της μεταγραφικής ενεργότητας της πρωτεΐνης Smad3 και των μεταλλαγμένων μορφών της	80
Εικόνα 27	82
Εικόνα 28	84
<b>Συζήτηση</b>	<b>85</b>
Ανταγωνισμός μεταξύ των μονοπατιών σηματοδότησης της πρωτεΐνης LMP1 και του παράγοντα TGF-β	85
Περιοχές της πρωτεΐνης LMP1 που απαιτούνται για την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB και την καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης του παράγοντα TGF-β	87
Δράση των μεταγωγέων του NF-κB, και των αρνητικώς επικρατούντων μορφών του, στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β	88
Ο NF-κB παράγοντας απενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β	89
Δομική και λειτουργική ανάλυση της πρωτεΐνης Smad3	90
Μελλοντικοί στόχοι	93
<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>94</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη του μηχανισμού, με τον οποίο η λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 1 (Latent membrane protein 1, LMP1) του ιού Epstein-Barr αναστέλλει το μονοπάτι σηματοδότησης του μετασχηματίζοντος αυξητικού παράγοντα TGF-β (Transforming Growth Factor β). Επίσης, μελετήθηκε η σχέση μεταξύ δομής και λειτουργίας της ανθρώπινης πρωτεΐνης Smad3, που αποτελεί έναν από τους κύριους μεταγωγείς του TGF-β μονοπατιού. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες κυττάρων COS-7 και HepG2, και τεχνικές επιμόλυνσης κυττάρων, μέτρησης δραστηριότητας ενζύμου λουσιφεράσης, αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in vivo* και *in vitro* και ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών. Παρατηρήθηκε ότι η LMP1 πρωτεΐνη αναστέλλει το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β, χρησιμοποιώντας το μονοπάτι που οδηγεί σε ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Εναλλακτικά, η LMP1 πρωτεΐνη είναι πιθανό να ενεργοποιεί κάποιο άλλο μονοπάτι, άγνωστο προς το παρόν, για την καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης του TGF-β. Ανιχνεύθηκε, επίσης, ασθενής *in vivo* αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών Smad3 και p65 (υπομονάδα του NF-κB, που σχηματίζει ομο- και ετερομερή). Τέλος, παρατηρήθηκε ότι έλλειμμα της περιοχής πρόσδεσης στο DNA (MH1), ή της περιοχής με την μεταγραφική ενεργότητα (MH2), της πρωτεΐνης Smad3, μειώνει δραματικά την ικανότητα ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που επάγονται από το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **Ο Epstein-Barr (EBV) ιός και η λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 1 (Latent Membrane Protein 1, LMP1)**

Ο Epstein-Barr (EBV) ιός ανήκει στην οικογένεια των γ ερποϊών και είναι εξαιρετικά διαδεδομένος στον άνθρωπο. Οι περισσότερες πρωταρχικές μολύνσεις συμβαίνουν τα πρώτα χρόνια της ζωής του ανθρώπου και είτε δεν εμφανίζουν συμπτώματα, είτε σχετίζονται με ήπιες πυρετώδεις ασθένειες. Όταν η μόλυνση συμβεί κατά την εφηβεία, ή σε ενηλίκους μπορεί να προκαλέσει μεταδοτική μονοπυρήνωση. Παρόλο που η πρωταρχική μόλυνση επιφέρει την ανοσοαπόκριση των T-λεμφοκυττάρων, ο EBV μπορεί να διατηρηθεί σε όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου, προκαλώντας άδηλη μόλυνση των B-λεμφοκυττάρων μνήμης. Το αποτέλεσμα αυτής της λανθάνουσας μόλυνσης είναι η παραγωγή μη διαφοροποιημένων, συνεχώς πολλαπλασιαζόμενων λεμφοκυττάρων, ιδιαίτερα σε ανοκατεσταλμένα άτομα. Ο EBV προκαλεί πολλές κακοήθεις ασθένειες στους ανθρώπους, οι οποίες έχουν ομαδοποιηθεί με βάση εθνικά ή γεωγραφικά κριτήρια. Έτσι, ο EBV, στη Νότιο Κίνα σχετίζεται με ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, στην Αφρική με το λέμφωμα Burkitt, στην Ευρώπη και τη Βόρειο Αμερική με την ασθένεια Hodgkin, και στις βιομηχανικές περιοχές με καρκινώματα του εντέρου.

Η μόλυνση και ο μετασχηματισμός ανθρώπινων, ανενεργών πρωταρχικών B-λεμφοκυττάρων σε συνεχώς πολλαπλασιαζόμενες λεμφοβλαστοειδείς κυτταρικές σειρές (LCLs), αποτέλεσαν αντικείμενο γενετικών και βιοχημικών αναλύσεων, ώστε να αποσαφηνιστούν τα γονίδια και οι πρωτεΐνες του EBV που είναι απαραίτητα ή εμπλέκονται στον μετασχηματισμό των B-λεμφοκυττάρων. Η έκφραση του EBV γενώματος στις LCLs, περιορίζεται σε δύο μη πολυαδενυλιωμένα RNAs (EBERs), σε μια οικογένεια δεξιόστροφων μεταγράφων (BARTs), σε έξι πυρηνικές αντιγονικές πρωτεΐνες, (τις EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C και -LP), καθώς και σε τρεις μεμβρανικές πρωτεΐνες λανθάνουσας μόλυνσης τις LMP1, -2A και -2B. Γενετικές αναλύσεις με ανασυνδυασμένο EBV αποκάλυψαν ότι για τον μετασχηματισμό και τη διατήρηση των LCLs χρειάζονται μόνο τα EBNA1, -2, -3A, -3C -LP και η LMP1 (1).

Η LMP1 (Latent Membrane Protein 1, λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 1) αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη



LMP1 είναι αναγκαία όχι μόνο για τον μετασχηματισμό των λεμφοκυττάρων σε LCLs, αλλά και για τον συνεχιζόμενο πολλαπλασιασμό τους (1). Επίσης, είναι η μόνη πρωτεΐνη του EBV που επιφέρει μετασχηματισμό σε μη λεμφικά κύτταρα (2). Σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών αρουραίων, η LMP1 προκαλεί αύξηση ανεξάρτητη της ακινητοποίησης των κυττάρων και της παρουσίας των αυξητικών παραγόντων, καθώς και απώλεια της αναστολής επαφής μεταξύ των κυττάρων. Σε καλλιεργούμενα επιθηλιακά κύτταρα, η έκφραση της LMP1 αναστέλλει την διαφοροποίηση. Επίσης, επάγει έκφραση δεικτών ενεργοποίησης (CD23, CD30, CD39, CD40), μορίων κυτταρικής επαφής (ICAM1, LFA1, LFA3) καθώς και αντι-αποπτωτικών παραγόντων (A20, Bcl-2), ενώ σε διαγονιδιακά ποντίκια προκαλεί καρκινογένεση. Πολλές από τις κυτταρικές φαινοτυπικές αλλαγές που επιφέρει η LMP1, οφείλονται σε αλλαγές της μεταγραφικής ρύθμισης (3).

### **Η πρωτεΐνη LMP1 χρησιμοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης του NF-κB.**

Η LMP1 είναι ένα συστατικά ενεργοποιημένο πρωτεϊνικό μόριο που μεταδίδει σήματα μετασχηματισμού από την πλασματική μεμβράνη, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και την αλλαγή στον ρυθμό αύξησης των μολυσμένων με τον ιό κυττάρων (1). Η σχηματική αναπαράσταση της δομής και λειτουργίας της LMP1 παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.

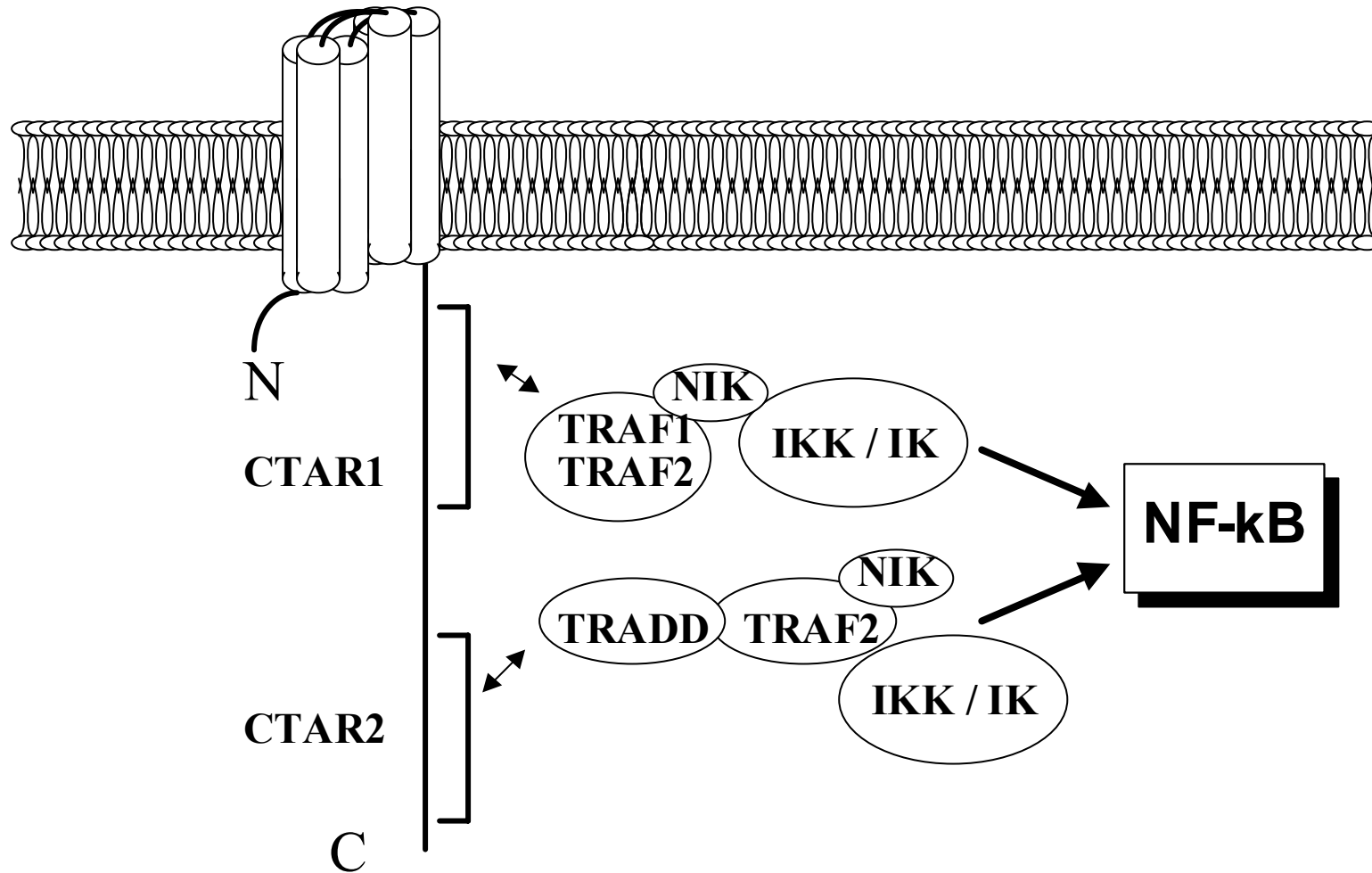
Ο NF-κB (ή Rel) είναι ένας εξαιρετικά διαδεδομένος μεταγραφικός παράγοντας που αποτελείται από τις πολυπεπτιδικές υπομονάδες p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50, και p52, οι οποίες συνθέτουν ομο- ή ετερο-διμερή. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μια κοινή περιοχή 300 αμινοξέων, που χαρακτηρίζεται ως Rel περιοχή ομολογίας και επάγει διμερισμό και πρόσδεση στο DNA. Το καλύτερα μελετημένο και συχνότερα απαντώμενο ετεροδιμερές, είναι το p50-p65. Ο NF-κB υπόκειται σε διάφορους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, φωσφορυλίωση, ουμπικιτινίωση, πρωτεολυτική αποικοδόμηση και πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά. Καθώς εμπλέκεται σε ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις σε εξωκυττάρια ερεθίσματα, όπως ο πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη, η ανοσοαπόκριση, η κυτταρική επιβίωση και απόπτωση, θεωρείται ένας ομοιοστατικός διακόπτης. Το γεγονός αυτό τον καθιστά στόχο διαφόρων ιικών παθογόνων μορίων,

που τον χρησιμοποιούν ώστε να διευκολύνουν τον διπλασιασμό τους, την επιβίωσή τους, και πιθανότατα, τη διαφυγή από την κυτταρική ανοσοαπόκριση.

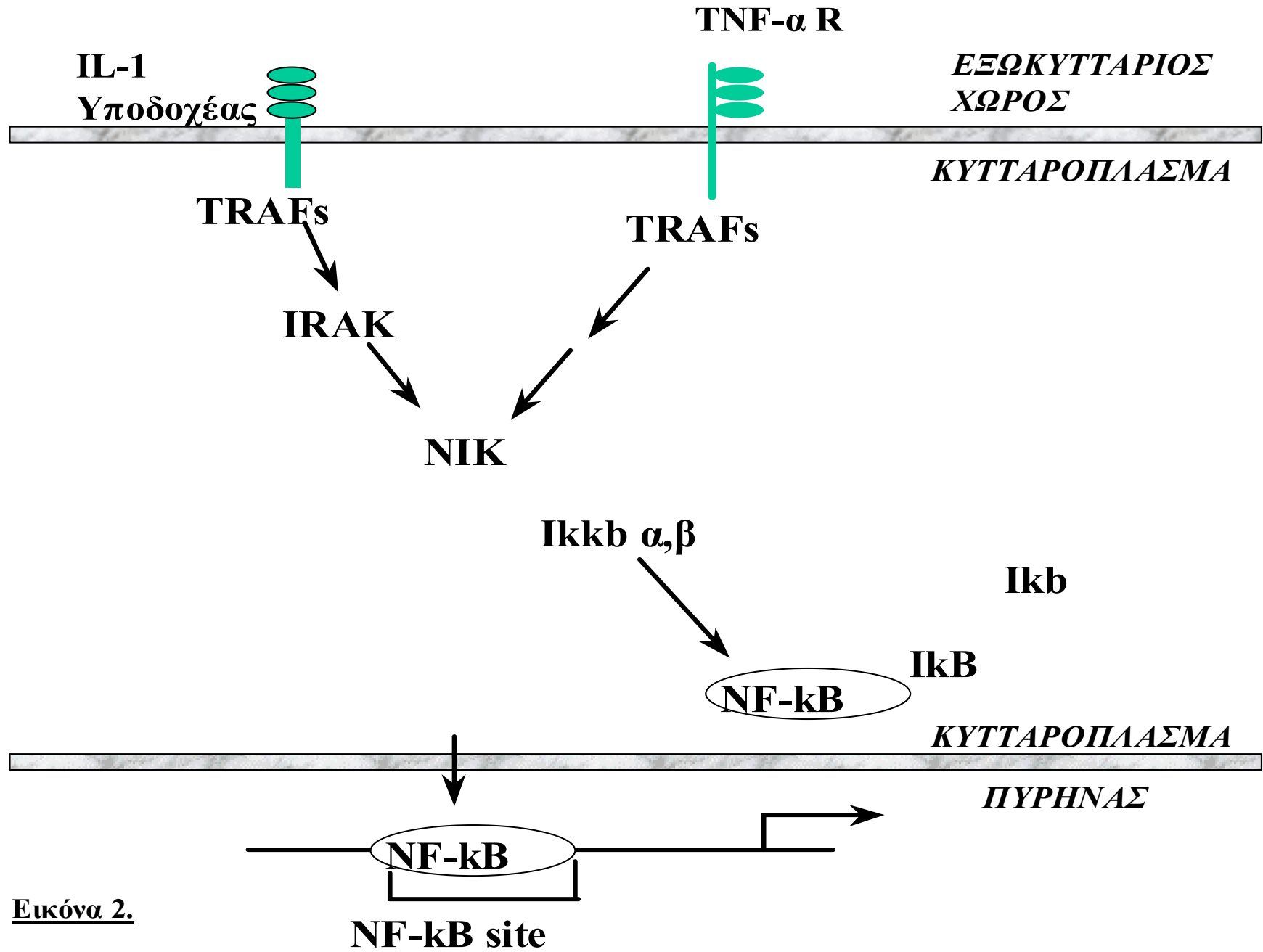
Η LMP1 για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB χρησιμοποιεί ένα μονοπάτι σηματοδότησης, παρόμοιο με εκείνο που επάγεται από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α, TNFα (Εικόνα 2). Μετά την πρόσδεση του TNFα στον υποδοχέα TNF-R1 (σε επιθηλιακά κύτταρα), ο τελευταίος τριμερίζεται και προσελκύει την TRADD και μέσω αυτής τις RIP και TRAFs. Ο TNF-R2, που εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα που προέρχονται από μυελό των οστών, επίσης τριμερίζεται και προσελκύει άμεσα τις TRAFs. Οι τελευταίες, ενεργοποιούν ένα μονοπάτι κινασών που αποτελείται από την κινάση που επάγει τον NF-κB (NF-κB Inducing Kinase, NIK, ομόλογη της κινάσης MEKK), και το σύμπλοκο κινασών της IκB που περιέχει τις IKKα και IKKβ. Στα περισσότερα κύτταρα ο NF-κB βρίσκεται σε ανενεργό μορφή στο κυτταρόπλασμα, καθώς συνδέεται με μια ανασταλτική, για την ενεργοποίησή του, πρωτεΐνη, την IκB κινάση. Η φωσφορυλίωση της κινάσης αυτής στις σερίνες 32 και 36, από το ενεργοποιημένο σύμπλοκο των IKKα και IKKβ έχει ως αποτέλεσμα την ουμπικιτινίωση και την αποικοδόμησή της στο 26S πρωτεοσώμα (4). Με τον τρόπο αυτό ο NF-κB απελευθερώνεται από το σύμπλοκο με την IκBa, και μεταφέρεται στον πυρήνα όπου προσδένεται σε αλληλουχίες ρυθμιστικών περιοχών / υποκινητών πολλών γονιδίων.

Έχει αποδειχθεί ότι η LMP1 ενεργοποιεί τον NF-κB, μέσω σηματοδότησης κατά μήκος του ίδιου μονοπατιού, καθώς αρνητικώς επικρατούσες μορφές των NIK, IKKα και IKKβ κινασών μπλοκάρουν την ενεργοποίηση του NF-κB χωρίς να επηρεάζουν την έκφραση του LMP1 (3, 5).

Η υπερέκφραση των αγρίου τύπου κινασών IKKα ή IKKβ έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της TNF - επαγόμενης ενεργοποίησης του NF-κB. Δεδομένης της ομοιότητας του τρόπου δράσης της LMP1 με τις TNF-R1 και TNF-R2, η ανακάλυψη ότι η υπερέκφραση των αντίστοιχων κινασών αναστέλλει την LMP1 - επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-κB, αποτέλεσε έκπληξη. Πιθανολογείται ότι η υπερέκφραση των κινασών αυτών αλλάζει την φυσιολογική στοιχειομετρία του μονοπατιού σηματοδότησης, απομονώνοντας ρυθμιστικούς παράγοντες, αναγκαίους για την ενεργοποίηση του NF-κB. Εναλλακτικά, είναι πιθανόν οι κινάσες IKKα και IKKβ να βρίσκονται ήδη σε πλεόνασμα, και η υπερέκφρασή τους να αυξάνει την αλληλεπίδρασή τους με άλλους στόχους ή ρυθμιστές τους, χωρίς να επιτρέπει την αποτελεσματική φωσφορυλίωση της IκBa (6).



**Εικόνα 1.** Σχηματική αναπαράσταση των δομικών και λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης LMP1. CTAR1: C-terminal Activation Region 1, CTAR2: C-terminal Activation Region 2. Τα βέλη δείχνουν αλληλεπίδραση μεταξύ του μορίου της LMP1 και των επαγωγέων του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.



Εικόνα 2.

## **Δομική και λειτουργική ανάλυση του μορίου της πρωτεΐνης LMP1.**

Η LMP1 είναι μια πρωτεΐνη 386 αμινοξέων, που αποτελείται από μια μικρή κυτταροπλασματική N-τερματική περιοχή, έξι διαμεμβρανικές περιοχές και μια μεγάλη κυτταροπλασματική περιοχή (C-terminal domain CTD), όπως περιγράφεται στην Εικόνα 1 (7). Η κυτταροπλασματική N-τερματική περιοχή προσδένει την πρώτη διαμεμβρανική περιοχή στο κυτταρόπλασμα, αλλά οι αλληλουχίες της δεν είναι σημαντικές για τον μετασχηματισμό από τον EBV, αρκεί να εκφράζονται οι προλίνες και οι αλανίνες που είναι απαραίτητες για την προαναφερθήσα πρόσδεση (8,9). Οι έξι διαμεμβρανικές περιοχές προκαλούν την αυθόρμητη συνάθροιση μορίων LMP1 στην πλασματική μεμβράνη. Ανασυνδυασμένοι EBV που εκφράζουν μη συναθροιζόμενες μεταλλαγμένες LMP1 που διαχέονται στην κυτταρική μεμβράνη δεν μετασχηματίζουν τα B λεμφοκύτταρα σε LCLs, ούτε επάγουν τον NF-κB (6).

Η συνάθροιση μορίων LMP1 καθιστά δυνατή την αλληλεπίδραση δύο θέσεων της CTD περιοχής της με κυτταρικές πρωτεΐνες και, συνεπώς, τη μετάδοση σήματος. Γενετικές και βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι αυτές οι δύο θέσεις της CTD περιοχής είναι κρίσιμες για τον μετασχηματισμό των κυττάρων και την ενεργοποίηση του NF-κB (10).

Η πρώτη θέση εντοπίζεται στα αμινοξέα 187-231. Αυτά είναι τα πρώτα 45 αμινοξέα της CTD περιοχής και αποτελούν θέση πρόσδεσης παραγόντων που αλληλεπιδρούν και με τον υποδοχέα του TNFα τον TNFR, και καλούνται TRAFs. Συγκεκριμένα, προσδένονται οι TRAF1, TRAF2, TRAF3 (ανασταλτικός της επαγωγής σήματος) και TRAF5. Τα αμινοξέα αυτά ευθύνονται, κατά ένα ποσοστό 25% σε σχέση με την wt LMP1 (εφόσον υπάρχουν και το N-τερματικό άκρο και οι έξι διαμεμβρανικές περιοχές), για την LMP1- επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-κB, και για το λόγο αυτό αναφέρονται ως η C-τερματική περιοχή ενεργοποίησης 1 (C-terminal activation region 1, CTAR1) (2). Έχει δειχθεί ότι έλλειμμα 27 κωδικονίων στην περιοχή CTAR1 καθιστά αδύνατο τον μετασχηματισμό των λεμφοκυττάρων από τον EBV (9). Για τον λόγο αυτό η περιοχή CTAR1 ονομάζεται και θέση μετασχηματισμού 1 (Transforming effector site 1, TES 1) (6).

Η δεύτερη θέση εντοπίζεται στα αμινοξέα 352-386 της περιοχής CTD, τα οποία αλληλεπιδρούν αφ' ενός με την TRADD και αφ' ετέρου με την RIP πρωτεΐνη (TNF Receptor-Interacting Protein) (10). Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν και με τον TNFR. Τα αμινοξέα αυτά ευθύνονται, κατά ένα ποσοστό 75% σε σχέση με

την wt LMP1 (εφόσον υπάρχουν και το N-τερματικό άκρο και οι έξι διαμεμβρανικές περιοχές), για την LMP1- επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-κB, και για το λόγο αυτό αναφέρονται ως η C-τερματική περιοχή ενεργοποίησης 2 (C-terminal activation region 2, CTAR2) (2). Έλλειμμα στην περιοχή CTAR2, έχει ως αποτέλεσμα, ο ανασυνδυασμένος EBV να μη μετασχηματίζει τα Β-λεφοκύτταρα. Έτσι, η CTAR2 περιοχή καλείται και θέση μετασχηματισμού 2 (TES 2) (10).

Προφανώς, η περιοχή TES1 συνεντοπίζεται με την περιοχή CTAR1, ενώ η TES2 με την CTAR2. Συνοπτικά, η πρόσδεση των TRAFs στην TES1 επάγει ενεργοποίηση του NF-κB από την CTAR1, ενώ η πρόσδεση της TRADD και RIP στην TES2 επάγει ενεργοποίηση του NF-κB από την CTAR2 (1).

Στην περιοχή CTAR1, τα αμινοξέα 204-208 συνθέτουν το μοτίβο PXQXT/S, το οποίο συναντάται και στην περιοχή με την οποία αλληλεπιδρούν μελη της οικογένειας TNFR με τις TRAFs. Μεταλλάξεις του P204 ή του Q206 σε αλανίνη, αποτρέπουν την πρόσδεση των TRAFs και μειώνουν την ενεργοποίηση του NF-κB, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι TRAFs αποτελούν τους επαγωγείς σηματοδότησης για αυτή την ενεργοποίηση (1). Η ενεργοποίηση του NF-κB αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της έκφρασης των TRAF1, EBI3, EGFR, CD40, LFA-3 και ICAM-1 (11, 12). Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της TRAF1 από τον NF-κB υποδηλώνει μηχανισμό επανατροφοδότησης, με τον οποίο η LMP1 (μέσω του NF-κB) ενεργοποιεί την έκφραση πρωτεϊνών που επάγουν τη μετάδοση του σήματος από την ίδια.

Στην περιοχή CTAR2 τα αμινοξέα 379-384 είναι κρίσημα για την ενεργοποίηση του NF-κB, ενώ, σε κύτταρα 293 (Human Embryonic Kidney cells, HEK), τα αμινοξέα 376-386 επαρκούν για τη εν λόγω ενεργοποίηση, όπως αποκάλυψαν μελέτες με χρήση μεταλλάξεων. Μάλιστα, η περιοχή αυτή ευθύνεται σχεδόν εξ ολοκλήρου για την LMP1-επαγόμενη ενεργοποίηση της c-jun N-τερματικής κινάσης (JNK) σε 293HEK κύτταρα (13). Η TRADD, μετά την πρόσδεσή της στην CTAR2, ενεργοποιεί τον NF-κB μέσω συνάθροισης μορίων TRAF2. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι μεταλλάξεις της TRADD στην περιοχή αλληλεπίδρασης με την TRAF2 ή χρήση αρνητικών επικρατούντων μορφών της TRAF2, αναστέλλουν μερικώς την μέσω LMP1 TES2/CTAR2 ενεργοποίηση του NF-κB (10). Η περιοχή της LMP1 TES2/CTAR2 που αλληλεπιδρά με την RIP είναι η ίδια με την περιοχή που αλληλεπιδρά με την TRADD, ωστόσο ο βαθμός της αλληλεπίδρασης είναι ασθενέστερος στην περίπτωση της RIP. Σε αντίθεση με τον

TNF-R1, η LMP1 δεν απαιτεί την RIP για την ενεργοποίηση του NF-κB σε κύτταρα Jurkat (1, 14). Επομένως η RIP δεν φαίνεται να αποτελεί κρίσιμο επαγωγέα της ενεργοποίησης του NF-κB (15).

Έλλειμμα των αμινοξέων 185-211 της TES1/CTAR1, αποτρέπει την πρόσδεση των TRAFs και μειώνει την ενεργοποίηση του NF-κB, αλλά δεν επηρεάζει την ενεργοποίησή του από την TES2/CTAR2, μέσω της TRADD. Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι ανασυνδυασμένοι EBV, που εκφράζουν το N-τερματικό άκρο, τις έξι διαμεμβρανικές περιοχές και την περιοχή TES1/CTAR1, είναι ικανοί για αρχικό μετασχηματισμό των μολυσμένων κυττάρων, αλλά αλληλουχίες εκτός της TES1/CTAR1, και συγκεκριμένα οι αλληλουχίες της TES2/CTAR2 είναι εκείνες που εμπλέκονται σε αποτελεσματικό και μακροπρόθεσμο μετασχηματισμό για τη δημιουργία LCLs (10). Από τα προαναφερθέντα προκύπτει, επίσης, ότι μόνο η ενεργοποίηση του NF-κB δεν επαρκεί για τον κυτταρικό μετασχηματισμό, καθώς και οι δύο θέσεις ενεργοποίησης του LMP1 είναι κρίσιμες για το μετασχηματισμό των B-λεμφοκυττάρων. Συνεπώς, κάθε μία από τις TES1/CTAR1 και TES2/CTAR2 έχει ξεχωριστές, απαραίτητες και αλληλοσυμπληρούμενες ιδιότητες (1). Τα παρόμοια αποτελέσματα των αρνητικώς επικρατούντων μορφών των NIK, IKKα και IKKβ στην ενεργοποίηση του NF-κB που επάγεται είτε από την TES1/CTAR1, είτε από την TES2/CTAR2, έρχονται να ενισχύσουν την υπόθεση ότι οι βασικές διαφορές των επιπτώσεων των TES1/CTAR1 και TES2/CTAR2 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την γονιδιακή ρύθμιση, οφείλονται σε διαφορές βιοχημικών αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν σε στάδιο προηγούμενο της ενεργοποίησης των NIK, IKKα και IKKβ (3, 6, 10).

Η περιοχή ανάμεσα στις TES1/CTAR1 και TES2/CTAR2 αποτελεί το 60% της συνολικής CTD περιοχής και περιλαμβάνει τα αμινοξέα 232-351. Στην περιοχή αυτή περιλαμβάνονται 4 ατελείς επαναλήψεις μιας συντηρημένης αλληλουχίας (253-301), μια αλληλουχία PPQLT (320-324), μια θέση δράσης πρωτεάσης που παίζει ρόλο στον καταβολισμό της LMP1, και 19 θέσεις πιθανής φωσφορυλίωσης σε σερίνες και θρεονίνες. *In vitro* μελέτες αποκάλυψαν ότι πλασμίδια που εκφράζουν LMP1Δ232-351 και wt LMP1, επάγουν το ίδιο αποτελεσματικά την ενεργοποίηση του NF-κB και του JNK. Επομένως, είτε η περιοχή αυτή δεν είναι σημαντική για τον πρωταρχικό μετασχηματισμό των B-λεμφοκυττάρων, είτε υπάρχουν θέσεις με θετική και αρνητική δράση, η συνολική απομάκρυνση των οποίων δεν επιφέρει δραματικές αλλαγές. Η περιοχή αυτή ίσως παίζει ρόλο ρυθμιστή της δράσης των TES1/CTAR1

και TES2/CTAR2, καθιστώντας τις προσιτές σε πρωτεΐνες. Ίσως, όμως, έχει άλλη δράση, ανεξάρτητη από εκείνη των TES1/CTAR1 και TES2/CTAR2 (16).

### **Η έκφραση της LMP1 αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση.**

Η έκφραση της LMP1 σε LCLs επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής των κυττάρων αυτών, αυξάνοντας την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, Mcl-1, A20 και TRAF1. Τα γονίδια των δύο τελευταίων αποτελούν στόχους του NF-κB. Συνεπώς, η ενεργοποίηση του NF-κB από την LMP1 επάγει την έκφραση πρωτεϊνών που αναστέλλουν τον θάνατο των μολυσμένων με τον ιό EBV, λεμφοκυττάρων (1) (βλ. παρακάτω).

### **Διαφορές μεταξύ της LMP1 - και TNFR - επαγόμενης σηματοδότησης.**

Η ανακάλυψη δύο νέων πρωτεϊνών έδωσε νέα στοιχεία συσχέτισης των μονοπατιών δράσης του LMP1 και του TNFR. Οι LAP1 και EB16 είναι ανθρώπινες πρωτεΐνες ομόλογες των TRAF2 και TRAF1, αντίστοιχα. Πρόκειται για πρωτεΐνες που προσδέονται στον p80 TNFR, αλλά που βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν και συνεντοπίζονται και με την LMP1 στην κυτταρική μεμβράνη. Τα παραπάνω συνδέουν τον LMP1-επαγόμενο μετασχηματισμό με τη μετάδοση σήματος από την οικογένεια των TNFR. Η διαφορά ανάμεσα σε TNFR και LMP1 είναι ότι ο δεύτερος επάγει σήματα αύξησης και ενεργοποίησης του NF-κB, συνεχώς, ακόμα και απουσία εξωκυττάρου ερεθίσματος.

Προτείνεται επίσης ένα μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο, η συνάθροιση LMP1-TRAFs βοηθά στο σχηματισμό μεγαλύτερων και σταθερότερων συμπλόκων TNFR-TRAFs, μέσω αλληλεπιδράσεων των coiled-coils των TRAFs. Η CTD περιοχή του LMP1 και μέλη της οικογένειας TNFR μπορεί να αλληλεπιδρούν ακόμα και με διαφορετικές περιοχές του ίδιου LAP1 μορίου. Η αλληλεπίδραση των μονοπατιών σηματοδότησης του LMP1 και του TNFR, είναι σημαντική για τον EBV. Η NF-κB ενεργοποίηση από τους LMP1 και TNFR ενισχύει τη μεταγραφή, ενώ η πρόσδεση της LAP1 στην LMP1, είναι πιθανό να ανταγωνίζεται την πρόσδεσή της στον TNFR,



μπλοκάροντας είτε τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από τον υποδοχέα αυτόν, είτε άλλες λειτουργίες σημαντικές για την άμυνα του κυττάρου ξενιστή (2).

Πειράματα που έγιναν σε HEK293 κύτταρα, έδειξαν ότι η μετάδοση σήματος από την περιοχή TES2/CTAR2, μέσω της TRADD, δεν είναι ικανή να επάγει απόπτωση, σε αντίθεση με την αντίστοιχη σηματοδότηση από τον TNF-R1 η οποία μετά την προσέλευση της FADD οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Επομένως, είτε η περιοχή TES2/CTAR2 δεν είναι ικανή να μεταδώσει προαποπτωτικό σήμα, είτε ενεργοποιεί ένα αντιαποπτωτικό μονοπάτι ανεξάρτητο του NF-κB (15). Ανεξάρτητα όμως από το τί από τα δύο ισχύει, το αποτέλεσμα είναι η επιβίωση του μολυσμένου με EBV κυττάρου.

### **Ανταγωνιστική δράση των μονοπατιών σηματοδότησης του TGF-β και της LMP1.**

Η πλειοτροπική κυτοκίνη TGF-β1 είναι μέλος μιας μεγάλης οικογένειας παραγόντων που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, και της απόπτωσης (βλ. παρακάτω). Από διάφορες μελέτες προκύπτουν στοιχεία που συσχετίζουν την πρωτεΐνη LMP1 με το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κυτταρικές σειρές με λέμφωμα του Burkitt, οι οποίες περιλαμβάνουν EBV-αρνητικά κύτταρα, κύτταρα στα οποία εκφράζονται κάποια γονίδια λανθάνουσας μόλυνσης του EBV (ομάδα I), κύτταρα που εκφράζουν όλα τα γονίδια λανθάνουσας μόλυνσης του EBV (ομάδα III), καθώς και EBV-μετασχηματισμένες LCLs. Τα περισσότερα EBV-αρνητικά κύτταρα, καθώς και τα κύτταρα της ομάδας I, οδηγούνταν σε απόπτωση ή G1 arrest παρουσία του TGF-β1. Οι κυτταρικές σειρές της ομάδας III και τα LCLs ανέστειλλαν πλήρως αυτή τη δράση του TGF-β1. Όλες οι κυτταρικές σειρές εξέφραζαν τις πρωτεΐνες Smads και τον υποδοχέα TGF-βRI (βλ. παρακάτω), αλλά εκείνες που δεν ανταποκρίνονταν στην αποπτωτική δράση του TGF-β1 χαρακτηρίζονται από μειωμένη έκφραση του TGF-βRII. Ωστόσο, στη μελέτη αυτή, η πρωτεΐνη LMP1 δεν αποδείχθηκε αναγκαία ή επαρκής για το μπλοκάρισμα της απόκρισης στον TGF-β1, καθώς αυτό το μπλοκάρισμα παρατηρήθηκε και σε κύτταρα που δεν εξέφραζαν την LMP1. Ίσως

άλλες πρωτεΐνες λανθάνουσας μόλυνσης του EBV, να προκαλούν τη μειωμένη έκφραση των TGF-βRII (17).

Ωστόσο, η μείωση του αριθμού των TGF-β υποδοχέων, δεν φαίνεται να αποτελεί τον πιο κοινό μηχανισμό με τον οποίο τα EBV μολυσμένα κύτταρα ξεφεύγουν του ελέγχου του πολλαπλασιασμού που επιφέρει ο παράγοντας αυτός. Πειράματα σε EBV-θετικά B-λεμφοκύτταρα έδειξαν ότι ο ιός προκαλεί και διατηρεί τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους, εκφράζοντας την LMP1 που αποτρέπει την TGF-β επαγόμενη αναστολή της κυτταρικής αύξησης (G1 arrest), χωρίς να επηρεάζει το μονοπάτι ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Επίσης, η LMP1 αναστέλλει την TGF-β επαγόμενη κυτταρική απόπτωση, επάγοντας την έκφραση της D2 κυκλίνης η οποία, σε συνδυασμό με την συνεχή έκφραση της cdk4, διατηρεί την pRb στην υπερφωσφορυλιωμένη (μη λειτουργική) της μορφή. Έτσι, το EBV μολυσμένο κύτταρο συνεχίζει να διαιρείται και επιβιώνει, ανεξάρτητα από την παρουσία και σηματοδότηση του TGF-β. Ο μηχανισμός με τον οποίο η LMP1 επάγει την έκφραση της D2 κυκλίνης δεν είναι γνωστός, αλλά ερευνάται ο ρόλος μεταγραφικών παραγόντων τύπου NF-κB (18).

Με τα προαναφερθέντα συμφωνούν και τα αποτελέσματα πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα ινοβλαστών ποντικού BALB/c 3T3 μολυσμένων με τον EBV. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η μέτρια έκφραση της LMP1 οδηγεί, αφ' ενός σε μη ανταπόκριση στην TGF-β1 επαγόμενη αναστολή της κυτταρικής αύξησης και αφ' ετέρου στο σχηματισμό όγκων σε SCID ποντίκια. Αντιθέτως, μεταλλαγμένες μορφές της LMP1 ή έκφρασή της σε χαμηλότερα επίπεδα, επιτρέπουν την ανταπόκριση των κυττάρων στα αποπτωτικά σήματα του TGF-β1 (19).

### **Ανταγωνιστική δράση των μονοπατιών σηματοδότησης του TGF-β και του TNFα**

Ο παράγοντας αύξησης συνδετικού ιστού (CTGF) είναι μια πρωτεΐνη που επάγεται από τον TGF-β αποκλειστικά και μόνο σε κύτταρα συνδετικού ιστού. Ο TNFα βρέθηκε ότι καταστέλλει την TGF-β επαγόμενη έκφραση της CTGF, σε καλλιέργειες φυσιολογικών ινοβλαστών. Πιθανολογείται ότι η ενεργοποίηση του NF-κB από τον TNFα, οδηγεί στην πρόσδεση του πρώτου στον υποκινητή του γονιδίου της CTGF ή στην επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στην καταστολή της έκφρασης της CTGF. Αντιθέτως, σε ινοβλάστες σκληροδέρματος, ο TNFα δεν καταστέλλει την

έκφραση της CTGF, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κολλαγόνου (20).

### **Σύγκλιση και συνεργασία των TGF-β και NF-κB μονοπατιών**

Στον υποκινητή του πρώιμα εκφραζόμενου γονιδίου JunB κυττάρων Mv1Lu, βρέθηκε μια θέση πρόσδεσης για Smad (Smad binding element SBE) και μια θέση πρόσδεσης του NF-κB. Παραδόξως, μεταλλάξεις στην SBE δεν εμπόδισαν την σηματοδότηση του TGF-β για την ενεργοποίηση του γονιδίου JunB. Αντιθέτως μεταλλάξεις στην κB θέση ανέστειλλαν πλήρως τη μεταγωγή σήματος, υποδηλώνοντας ότι αυτή είναι αναγκαία για την TGF-β επαγόμενη ενεργοποίηση του JunB. Η ενεργοποίηση αυτή απαιτεί την ακεραιότητα του NF-κB μονοπατιού. Ωστόσο, η TGF-β επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω NF-κB θέσεων δεν προκαλεί αύξηση της έκφρασης των υπομονάδων του NF-κB, ούτε άμεση φωσφορυλίωση και αποικοδόμηση της IκB, ούτε άμεση αύξηση της μετατόπισης των NF-κB υπομονάδων στον πυρήνα. Πιθανόν, οι ήδη ενεργοποιημένες, πυρηνικές υπομονάδες του NF-κB είναι προσιτές στο σήμα που επάγει ο TGF-β για την αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β συναντάται με το μονοπάτι του NF-κB στο επίπεδο του πυρήνα.

Μελέτες, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* υποδεικνύουν ότι διαφορετικά διμερή του NF-κB έχουν διαφορετικές ιδιότητες μεταγραφικής ενεργοποίησης. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του NF-κB και άλλων μεταγραφικών παραγόντων ευθύνονται για την επιλεκτική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τον NF-κB. Η συνέκφραση της υπομονάδας p52 ή p65 του NF-κB με τον μεταγραφικό παράγοντα Smad3, και μάλιστα παρουσία συνεχώς ενεργού TGF-βRI, αυξάνει την ενεργοποίηση του γονιδίου JunB. Η φωσφορυλίωση της Smad3 φαίνεται να είναι σημαντική για την αλληλεπίδρασή της με την p52, είτε αυξάνοντας την συγγένεια πρόσδεσής τους, είτε επιτρέποντας την είσοδο της Smad3 στον πυρήνα όπου είναι εφικτή η αλληλεπίδραση. Η MH2 περιοχή της Smad3 αλληλεπιδρά με την C-τερματική περιοχή των p300/CBP. Η N-τερματική περιοχή των p300/CBP προσδένεται στην ενεργό περιοχή της p65. Συνεπώς, οι p300/CBP θα μπορούσαν να

δρούν ως συνδετικά μόρια που φέρνουν σε επαφή τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες.

Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις Smads και τις υπομονάδες του NF-κB μπορεί να είναι σημαντική για τον έλεγχο διαφόρων υποκινητών. Το αποτέλεσμα, ωστόσο της αλληλεπίδρασης αυτής στην μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων, εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο. Τα στοιχεία αυτά ενισχύουν την άποψη για αλληλεπίδραση των Smad με μεταγραφικούς παράγοντες, καθώς και για το ρόλο που διαδραματίζουν οι Smad ως μεταγραφικοί συνενεργοποιητές (21).

Εξάλλου, πειράματα που έγιναν επίσης σε Mv1Lu κύτταρα, έδειξαν ότι μετά την ενεργοποίηση του JNK από τον TGF-β, ο πρώτος φωσφορυλιώνει την Smad3 σε περιοχή εκτός του μοτίβου -SSXS. Η φωσφορυλίωση αυτή διευκολύνει την ενεργοποίηση (φωσφορυλίωση) της Smad3 από το σύμπλοκο των υποδοχέων του TGF-β και συνεπώς και τη μεταφορά της στον πυρήνα. Η παρουσία των ενεργοποιημένων, από TGF-β, Smad3 και JNK έχει ως αποτέλεσμα την συνεργιστική ενεργοποίηση του PA1 υποκινητή (22).

### **TGF-β επαγόμενη μετάδοση σήματος από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα, μέσω των Smad πρωτεϊνών.**

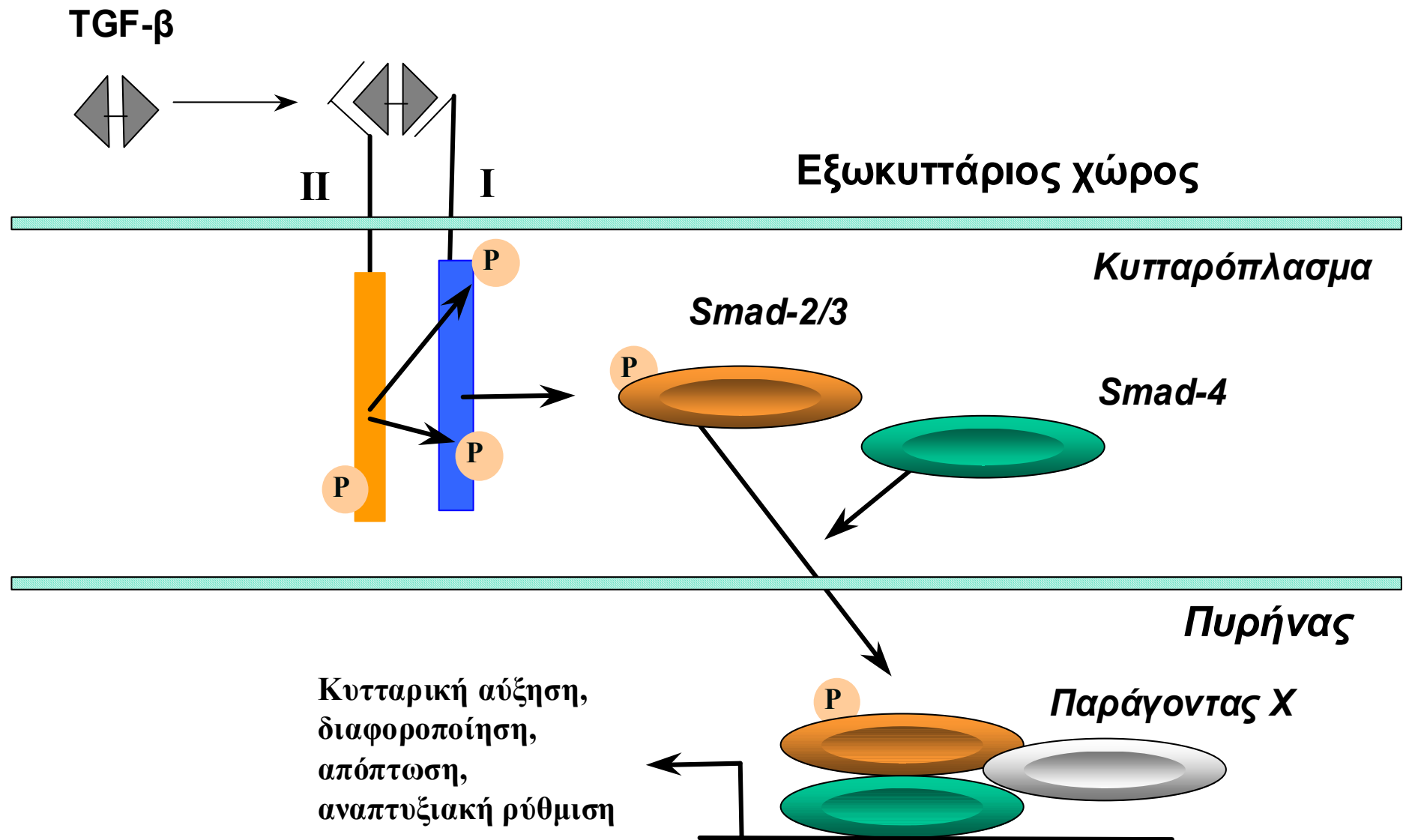
Η υπεροικογένεια του μετασχηματίζοντος αυξητικού παράγοντα β (TGF-β) είναι μια μεγάλη ομάδα εκκρινόμενων αυξητικών παραγόντων, που διαιρείται σε τρεις υποομάδες : τις TGF-βs, τις ακτιβίνες (activins) και τις πρωτεΐνες μορφογένεσης των οστών (BMPs). Η υπεροικογένεια αυτή εμπλέκεται σε διεργασίες ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της κυτταρικής μοίρας σε ενήλικους οργανισμούς, καθώς και του προτύπου οργάνωσης των οργανικών συστημάτων κατά την εμβρυογένεση. Οι TGF-βs, οι activins και οι BMPs χρησιμοποιούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς τύπου I και II με ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Ο TGF-β1 προσδέεται αρχικά σε ένα ομο-ολιγομερές σύμπλοκο συνεχώς ενεργοποιημένων υποδοχέων τύπου II. Η πρόσδεση του συνδέτη έχει ως αποτέλεσμα την προσέλκυση υποδοχέων τύπου I, και το σχηματισμό ενός ώριμου πιθανότατα τετραμερούς συμπλόκου. Η τύπου II κινάση φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου I σε μια συντηρημένη και πλούσια σε γλυκίνες και σερίνες περιοχή

(GS domain) και τον ενεργοποιεί. Ακολούθως, η ενεργοποιημένη τύπου I κινάση αναγνωρίζει και φωσφορυλιώνει μέλη του ενδοκυττάριου μονοπατιού σηματοδότησης, γνωστά ως Smad (από τα Sma και Mad γονίδια) (23). Η Εικόνα 3 αποτελεί σχηματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β.

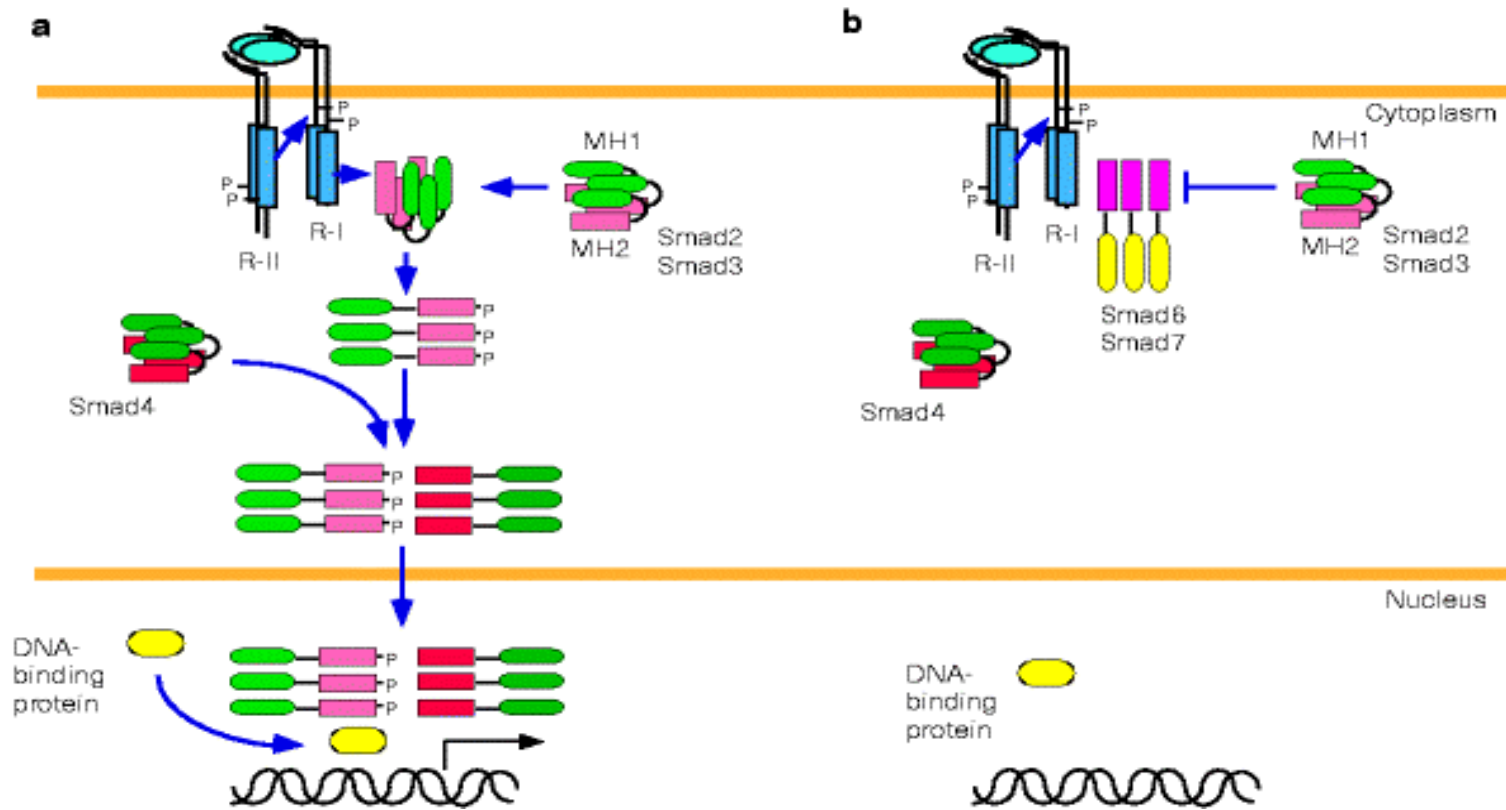
### **Οι τρεις κατηγορίες των Smad πρωτεϊνών.**

Με βάση δομικά και λειτουργικά κριτήρια, έχουν οριστεί τρεις ομάδες Smad πρωτεϊνών : οι Smad που ρυθμίζονται από υποδοχείς (Receptor-regulated Smads, R-Smads), οι ανασταλτικές Smad (Inhibitory Smads, I-Smads) και οι βοηθητικές Smad (co-Smads). Η οικογένεια των Smad είναι εξαιρετικά συντηρημένη και ομόλογα των προαναφερθέντων ομάδων έχουν αναγνωριστεί στους οργανισμούς *Xenopus*, *Drosophila* και *Caenorhabditis elegans*. Στην Εικόνα 4 δίνεται μια σχηματική αναπαράσταση των Smad πρωτεϊνών και του ρόλου τους κατά τη σηματοδότηση από τον TGF-β. Η τύπου I κινάση προσδένει και φωσφορυλιώνει ένα συντηρημένο SSXS μοτίβο που εντοπίζεται στην MH2 περιοχή των R-Smad. Αυτή η φωσφορυλίωση προκαλεί την αποσύνδεση της R-Smad από τον υποδοχέα και το σχηματισμό ενός ετερομερούς συμπλόκου μεταξύ της R-Smad και της co-Smad Smad4. Το σύμπλοκο αυτό μεταβαίνει στον πυρήνα, όπου οι R-Smad μεσολαβούν για την αλληλεπίδραση του συμπλόκου με πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA. Κατά αυτόν τον τρόπο προσελκύονται σε συγκεκριμένα ρυθμιστικά στοιχεία όπου σχηματίζουν σταθερά τετραμερή σύμπλοκα, που μέσω της MH1 περιοχής προσδένονται στο DNA. Έτσι, οι Smad δρουν είτε ως άμεσοι μεταγραφικοί παράγοντες, είτε ρυθμίζουν τη μεταγραφή ερχόμενες σε επαφή με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, δρώντας ως συνενεργοποιητές ή συνκαταστολείς (24). Συνεπώς, οι R-Smad, αλληλεπιδρώντας και με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και με την πυρηνική μεταγραφική μηχανή, παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της εξειδίκευσης της βιολογικής απόκρισης στον TGF-β.

Σε αντίθεση με τις R-Smad και τις co-Smad, οι I-Smad πρωτεΐνες μπλοκάρουν τη σηματοδότηση από τους TGF-β και BMP, καθώς σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με τους ενεργοποιημένους υποδοχείς, καθιστώντας τους απρόσιτους στις R-Smad. Η Smad7 αναστέλλει τη δράση και των TGFβ και των BMP υποδοχέων, ενώ η Smad6 φαίνεται να είναι ανασταλτική ειδικά για το BMP μονοπάτι. Εκτός της αναστολής της



**Εικόνα 3.** Σχηματική αναπαράσταση της σηματοδότησης από τον μετασχηματίζοντα αυξητικό παράγοντα TGF-β



**Εικόνα 4.** Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού σηματοδότησης του TGF- $\beta$ .

a) Ενεργοποίηση και δράση των R-Smad και της co-Smad. b) Ανασταλτική δράση των I-Smad.

λειτουργίας των υποδοχέων, η Smad6 μπορεί και αλληλεπιδρά με την φωσφορυλιωμένη Smad1 και εμποδίζει την επαφή της δεύτερης με τον υποδοχέα, παρέχοντας έναν άλλο μηχανισμό αναστολής της BMP σηματοδότησης. Η Smad7, απουσία σηματοδότησης εντοπίζεται στον πυρήνα, ενώ παρουσία TGF- $\beta$  εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η μεταγραφή των Smad6 και Smad7 επάγεται από TGF $\beta$ , activins και BMP, παρέχοντας μηχανισμό αρνητικής επανατροφοδότησης του TGF-μονοπατιού σηματοδότησης (24).

### **Λειτουργικές περιοχές των Smad πρωτεϊνών.**

Οι Smad πρωτεΐνες δεν φαίνεται να περιέχουν περιοχές ενζυμικής ενεργότητας και δρουν κατά τη σηματοδότηση, είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με το DNA. Οι Smad περιέχουν τρεις διακριτές περιοχές: τις εξαιρετικά συντηρημένες MH1 και MH2 περιοχές και μια ενδιάμεση, μη συντηρημένη περιοχή σύνδεσης (25, 26, 27).

Η MH1 περιοχή είναι γνωστό ότι προσδένεται άμεσα στο DNA καθώς και σε πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA, κατευθύνοντας τις Smad σε συγκεκριμένους πυρηνικούς στόχους (ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων ή/και πρωτεΐνες) (24). Η MH1 περιοχή της Smad3 κρυσταλλώθηκε παρουσία ενός τμήματος DNA 16 βάσεων που περιέχει δύο θέσεις πρόσδεσης Smad (SBE) που αποτελούνται από την αλληλουχία 5'-GTCT-3'. Τα παραπάνω συμφωνούν με έρευνες, σύμφωνα με τις οποίες οι αλληλουχίες πρόσδεσης των Smad3 και Smad4 αποτελούνται από μια συντηρημένη περιοχή δύο ανεστραμμένων επαναλήψεων των βάσεων CAGA (28). Η ίδια η MH1 περιοχή σχηματίζει μια συμπαγή σφαιρική δομή που αποτελείται από 4  $\alpha$ -έλικες, 6  $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες και 5 λούπες. Η πρόσδεση στο DNA πραγματοποιείται μέσω μιας δομής που αποτελείται από μια  $\beta$  hairpin η οποία έρχεται σε επαφή με την μεγάλη αύλακα του DNA (29).

Η MH1 περιοχή της Smad3 προσδένεται, σύμφωνα με *in vitro* πειράματα, στην ιμπορτίνη  $\beta$ , με μεγάλη ειδικότητα. Αντιθέτως, δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση με την ιμπορτίνη  $\alpha$ , υποδεικνύοντας ότι η μεταφορά των Smad πρωτεϊνών στον πυρήνα οφείλεται στην πρόσδεση στην ιμπορτίνη  $\beta$ . Μεταλλαγές στο βασικό μοτίβο Lys<sup>40</sup>LysLeuLysLys<sup>44</sup>, που αποτελεί σήμα μετατόπισης στον πυρήνα (NLS), εξαφανίζει την αλληλεπίδραση της Smad3 με την ιμπορτίνη  $\beta$ . Η Smad3 πλήρους



μήκους εμφανίζει ασθενή αλλά ειδική σύνδεση με την ιμφορτίνη β, η οποία ενισχύεται μετά την φωσφορυλίωσή της από τον TGF-RI. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ένα μοντέλο για την πυρηνική είσοδο της Smad3. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, απουσία ερεθίσματος, η Smad3 παραμένει στο κυτταρόπλασμα έχοντας το NLS μοτίβο της MH1 περιοχής της καλυμμένο, λόγω της ενδομοριακής αλληλεπίδρασης μεταξύ των MH1 και MH2. Παρουσία TGF-β, ο τύπου I υποδοχέας φωσφορυλιώνει την Smad3 στο C-τερματικό άκρο της και συνεπώς επάγει μια μορφολογική αλλαγή στην διαμόρφωση του μορίου. Η αλλαγή αυτή εκθέτει το NLS στην ιμφορτίνη β η οποία και μεταφέρει την Smad3 (και την προσδεδεμένη σε αυτήν Smad4) στον πυρήνα (30).

Η MH2 είναι περιοχή αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες όπως υποδοχείς, την πρωτεΐνη SARA, τις co-Smads, καθώς και με πρωτεΐνες που προσδέονται στο DNA και σε μεταγραφικούς συνενεργοποιητές (27). Ο καθορισμός της κρυσταλλικής δομής της MH2 περιοχής της Smad4 αποκάλυψε 5 α-έλικες (H1-H5) και 3 λούπες (L1, L2 και L3) που περικλύουν μια δομή β-sandwich. Στον κρύσταλλο η MH2 περιοχή της Smad4 σχηματίζει τριμερές, και μεταλλαγές που χαρακτηρίζουν καρκινικές καταστάσεις, χαρτογραφούνται στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών. Τα κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα προτείνουν επίσης, ότι τριμερή R-Smad και τριμερή Smad4 σχηματίζουν ένα εξαμερές (31). Ωστόσο, βιοχημικά στοιχεία υποδεικνύουν ότι σε κύτταρα θηλαστικών οι Smads υπάρχουν ως μονομερή που μετά την ενεργοποίησή τους σχηματίζουν τριμερή σύμπλοκα (32).

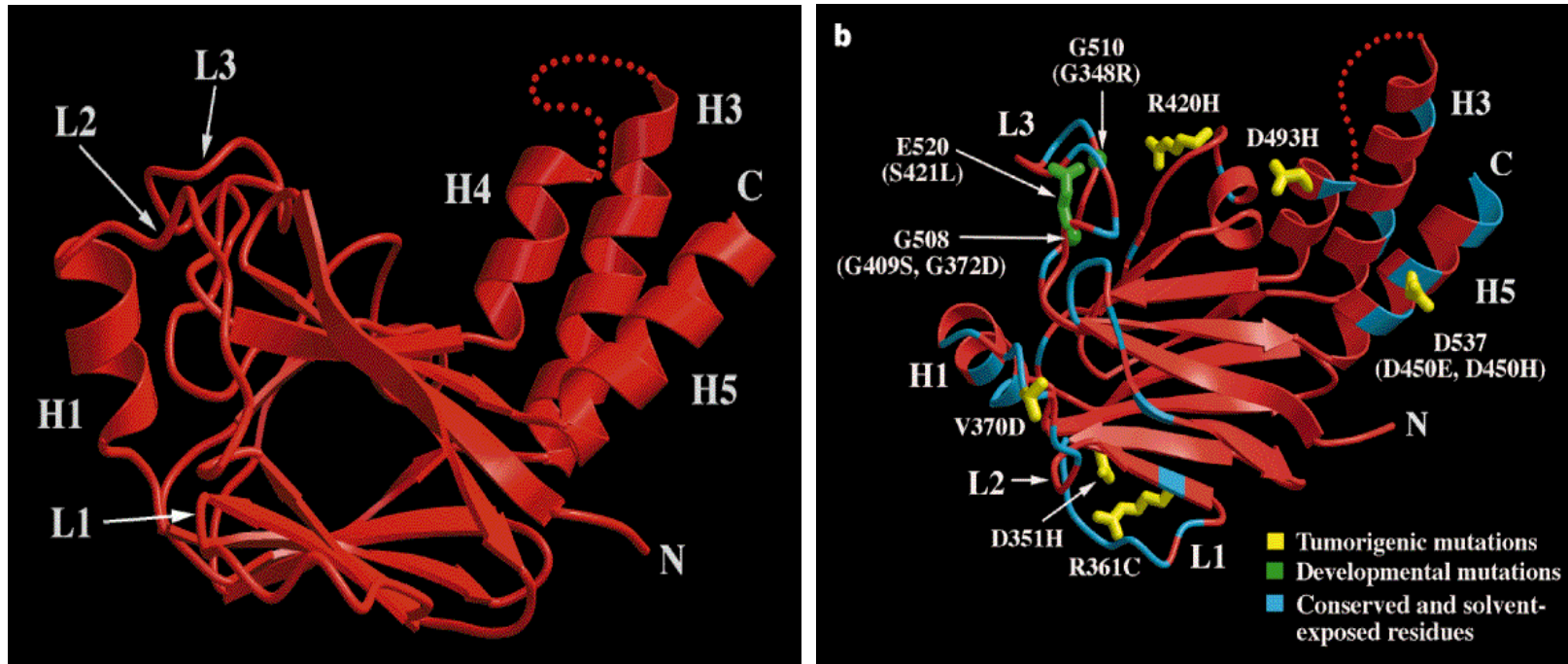
Η συνκρυστάλλωση της MH2 περιοχής της Smad2 με την περιοχή της SARA που προσδέεται στην Smad2, αποκάλυψε την ύπαρξη μιας βασικής κοιλότητας που ίσως χρησιμεύει στην πρόσδεση της Smad2 στην φωσφορυλιωμένη GS περιοχή των υποδοχέων τύπου I (24). Η SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) είναι μια πρωτεΐνη που περιέχει ένα FYVE domain παρακείμενο της θέσης πρόσδεσης των Smads, το οποίο προσδέοντας phosphatidylinositol-3-phosphate, αγκυροβολεί πρωτεΐνες στις μεμβράνες. Στη SARA προσδέονται οι μη φωσφορυλιωμένες Smad2 και Smad3. Ταυτόχρονα στην ίδια περιοχή συνεντοπίζονται TGF-β υποδοχείς, με τα ετερομερή σύμπλοκα των οποίων αλληλεπιδρά η SARA μέσω της C-τερματικής περιοχής της. Προφανώς η SARA προσελκύει τις Smad πρωτεΐνες σε μεμβράνες, όπου εντοπίζεται η ενεργότητα κινάσης των υποδοχέων (33).

Η α έλικα H1 και η L3 της MH2 περιοχής θεωρούνται ότι ελέγχουν την εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης των R-Smads και των υποδοχέων (34). Μάλιστα,

στην περίπτωση της Smad2, η L3 βρίσκεται δίπλα στην προαναφερθείσα βασική κοιλότητα. Στους υποδοχείς τύπου I, η λούπα L45 της περιοχής με την ενεργότητα κινάσης, ευθύνεται για την εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης με τις Smads. Πιθανότατα, η πρόσδεση υποδοχέα-Smad, πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης μεταξύ της L3 της Smad πρωτεΐνης και της L45 του υποδοχέα, ενώ η βασική κοιλότητα μπορεί να επάγει αυτή την αλληλεπίδραση, προσδένοντας την Smad στην φωσφορυλιωμένη GS περιοχή του υποδοχέα. Η H2 έλικα της Smad2 θεωρείται καθοριστική για την αλληλεπίδραση με τον πυρηνικό παράγοντα FAST (Forkhead Activin Signal Transducer). Συνεπώς, οι L3, H1 και H2 φαίνεται να είναι σημαντικές στη διατήρηση της εξειδίκευσης του μονοπατιού σηματοδότησης (35). Στην Εικόνα 5 φαίνεται η δομή της Smad3 (A), καθώς και μεταλλάξεις σε διάφορες περιοχές του μορίου της που σχετίζονται με καρκινογένεση (B).

Η απομάκρυνση της MH1 και της περιοχής σύνδεσης των R-Smad οδηγεί σε μια κουτσουρεμένη (truncated) πρωτεΐνη που μπορεί να ενεργοποιεί συστατικά τη μεταγραφή. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η MH1 περιοχή αναστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα της MH2 (23). Πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν, επίσης, ότι η φωσφορυλίωση της C-τερματικής αλληλουχίας SSxS των R-Smad από τους υποδοχείς, απαλλάσσει τις περιοχές MH1 και MH2 από αμοιβαία ανασταλτική αλληλεπίδραση και οδηγεί τις R-Smad σε ενεργοποίηση και μεταφορά στον πυρήνα (36).

Η περιοχή σύνδεσης των MH1 και MH2, παρά το γεγονός ότι είναι η λιγότερο συντηρημένη μεταξύ των ειδών, περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης για κινάσες που κατευθύνονται σε προλίνες. Οι θέσεις αυτές μπορεί να είναι σημαντικοί στόχοι για αλληλεπίδραση με το MAPK μονοπάτι. Επίσης, στην περίπτωση των R-Smad και I-Smad, στην εν λόγω περιοχή περιέχεται και ένα συντηρημένο PY μοτίβο, πλούσιο σε προλίνη, το οποίο αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που περιέχουν το WW domain. Το μοτίβο αυτό αποτελεί θέση άμεσης πρόσδεσης σε συνδετάσες ουμπικιουτίνης (37).



**Εικόνα 5. Α.** Δομή του μορίου της Smad3 πρωτεΐνης. **Β.** Περιοχές του μορίου της Smad3 που απαντώνται μεταλλαγμένες σε περιπτώσεις καρκινογένεσης (υποδεικνύονται με κίτρινο και πράσινο χρώμα), καθώς και συντηρημένες, εκτεθειμένες σε αλληλεπιδράσεις περιοχές (γαλάζιο χρώμα).

## **Ο ρόλος της ουμπικιτινίωσης στην TGF-β σηματοδότηση**

Η παύση της σηματοδότησης των TGF-β και BMP, προϋποθέτει την απομάκρυνση των φωσφορυλιωμένων Smad πρωτεϊνών. Έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί για την απομάκρυνση αυτή. Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι η πρωτεόλυση μέσω ουμπικιτίνης. Η ουμπικιτινίωση πραγματοποιείται μέσω μιας ενζυματικής διαδικασίας που περιλαμβάνει τις E1, E2 και E3 συνδετάσες πρωτεϊνών στην ουμπικιτίνη. Η E1 προσελκύει τις πρωτεΐνες υποστρώματα, η E2 μεταφέρει την ουμπικιτίνη στο υπόστρωμα ή στην E3 για να τη μεταφέρει στην πρωτεΐνη. Η ουμπικιτινωμένη πρωτεΐνη αναγνωρίζεται και αποικοδομείται στο 26S πρωτεόσωμα (38). Η ουμπικιτινίωση των Smad πρωτεϊνών φαίνεται ότι συμβαίνει μετά την είσοδό τους στον πυρήνα, αλλά η στόχευσή τους από την E1, ενδέχεται να συμβαίνει πριν την ενεργοποίησή τους, στο κυτταρόπλασμα (39).

Πρόσφατα αναγνωρίστηκαν οι ογκοπρωτεΐνες Ski και SnoN, ως πυρηνικοί ανταγωνιστές της σηματοδότησης μέσω των Smad πρωτεϊνών (βλ. παρακάτω) (40, 41). Ωστόσο, η TGF-β σηματοδοτεί ραγδαία αποικοδόμηση των Ski και SnoN από το σύστημα ουμπικιτίνης-πρωτεοσώματος (41). Συνεπώς, η αποικοδόμηση όχι μόνο των Smads, αλλά και σχετιζόμενων με αυτές πρωτεϊνών, παίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι σηματοδότησης.

## **Πυρηνικές λειτουργίες των Smad πρωτεϊνών.**

Οι αρχικές μελέτες της λειτουργίας των Smad ως μεταγραφικών ρυθμιστών, αποκάλυψαν ότι μπορούν να προσδένονται άμεσα στο DNA. Ωστόσο, οι πρόσφατες ανακαλύψεις για την αλληλεπίδραση των Smad με μεγάλο αριθμό DNA προσδενόμενων πρωτεϊνών, υποδεικνύουν ότι ίσως ο πρωταρχικός ρόλος των Smad δεν είναι η στόχευση συγκεκριμένων γονιδίων μέσω της πρόσδεσης στο DNA, αλλά η λειτουργία τους ως συν-ρυθμιστές της μεταγραφικής ενεργότητας (24).

## **Πρόσδεση των Smad πρωτεϊνών στο DNA**

Εκτεταμένες μελέτες των Smad3 και Smad4 απέδειξαν την πρόσδεσή τους στο DNA. Στις περισσότερες περιπτώσεις, μεταλλαγές στα ρυθμιστικά στοιχεία υποκινητών όπου προσδένονται οι Smads, μειώνει την ενεργοποίηση των υποκινητών αυτών (27). Ωστόσο, οι Smads φαίνεται να προσδένονται στο DNA με σχετικά μικρή εξειδίκευση και συγγένεια. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την παρουσία μιας προσθήκης στην MH1 περιοχή της Smad2 που αναστέλλει την πρόσδεσή της στο DNA, υποδεικνύουν ότι για την δράση των Smads ως μεταγραφικών ρυθμιστών, πρέπει να παίζουν σημαντικό ρόλο και οι αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA.

## **Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Smad με πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA.**

Υπάρχει μεγάλος αριθμός παραδειγμάτων στα οποία οι Smads συνεργάζονται με DNA προσδενόμενες πρωτεΐνες για την ρύθμιση της μεταγραφής. Η FAST-1 πρωτεΐνη προσδένεται στην αποκρινόμενη σε ακτιβίνη περιοχή του υποκινητή του Mix.2 γονιδίου, καθώς και σε αντίστοιχη περιοχή του υποκινητή του goosecoïd γονιδίου. Απουσία σήματος, η FAST-1 προσδένεται στα προαναφερθέντα ρυθμιστικά στοιχεία, αλλά δεν ενεργοποιεί τη γονιδιακή μεταγραφή. Παρουσία TGF-β ή ακτιβίνης, στη ρυθμιστική περιοχή σχηματίζεται ένα σύμπλοκο που περιλαμβάνει την FAST-1 και τις Smad2 και Smad4, το οποίο και ενεργοποιεί την μεταγραφή. Μάλιστα, πρώτα προσδένεται στο DNA η FAST-1, με την οποία αλληλεπιδρά άμεσα η Smad2, ώστε να προσελκύσουν στο σύμπλοκο την Smad4. Η MH1 περιοχή της Smad4 προσδένεται στο DNA και η επαφή αυτή είναι σημαντική για την σταθεροποίηση της πρόσδεσης του συμπλόκου στο DNA (42). Έχει, εξάλλου, δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες Smad, μέσω αλληλεπίδρασης με τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1, μπορούν να ενεργοποιούν γονιδιακή μεταγραφή από τον υποκινητή p21 (43).

Οι Smad συνεργάζονται και με DNA-προσδενόμενες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος άλλων μονοπατιών. Πολλές θέσεις απόκρισης στον TGF-β περιέχουν θέσεις πρόσδεσης του AP1, οι οποίες ενεργοποιούνται από το ετεροδιμερές c-Jun/c-fos. Η Smad3 αλληλεπιδρά άμεσα με την φωσφορυλιωμένη c-

Jun μέσω της MH1 και της περιοχής σύνδεσης (linker), και έμμεσα με την c-fos μέσω της c-Jun. Απουσία του ετεροδιμερούς ο TGF-β και η Smad3 επάγουν ασθενώς τη μεταγραφή από ρυθμιστικά στοιχεία στα οποία προσδένεται ο AP1, ενώ παρουσία ενεργού ετεροδιμερούς παρατηρείται έντονη μεταγραφική ενεργότητα. Η φωσφορυλίωση (ενεργοποίηση) της c-Jun προκύπτει από την ενεργότητα κινάσης της Jun. Επομένως, παρατηρείται ένα σημαντικό σημείο συνάντησης των μονοπατιών σηματοδότησης των Smad και Jun (44, 45).

Πριν ακόμα αναγνωριστούν οι Smads, είχε αναφερθεί συνεργατική αλληλεπίδραση μεταξύ των TGF-β και της βιταμίνης D. Η ρυθμιστική περιοχή που αποκρίνεται στην βιταμίνη D (Vitam D Response Element, VDRE), ανταποκρινόταν επίσης στον TGF-β, αλλά μόνο παρουσία της βιταμίνης D. Η Smad3 δρα ως σενενεργοποιητής του υποδοχέα της βιταμίνης D (Vitamin D Receptor, VDR) μέσω της ικανότητάς της να σχηματίζει σύμπλοκο με τον σενενεργοποιητή του υποδοχέα στεροειδών, ο οποίος εξαρτάται από την παρουσία του TGF-β και της βιταμίνης D. Φαίνεται ότι η Smad3 επάγει μια συνομιλία μεταξύ των μονοπατιών σηματοδότησης του TGF-β και της βιταμίνης D (46). Στη συνομιλία αυτή εμπλέκεται και η Smad7, η οποία αναστέλλει το σχηματισμό του VDR-Smad3 συμπλόκου, ρυθμίζοντας αρνητικά τη σηματοδότηση μεταγραφής από τον VDR (47).

### **Smad-επαγόμενη ενεργοποίηση της μεταγραφής**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η MH2 περιοχή είναι υπεύθυνη για την Smad-επαγόμενη ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η ενεργοποίηση αυτή πιθανότατα συμβαίνει μέσω της προσέλευσης (από τις Smad) των μεταγραφικών σενενεργοποιητών p300/CBP σε υποκινητές στόχους (27). Οι p300/CBP χαρακτηρίζονται σενενεργοποιητές πολλών μεταγραφικών παραγόντων, καθώς φέρνουν σε επαφή τους τελευταίους με την βασική μεταγραφική μηχανή. Παρατηρείται άμεση αλληλεπίδραση των p300/CBP με την C-τερματική περιοχή των Smad2 και Smad3, η οποία ενισχύεται από την TGF-β επαγόμενη φωσφορυλίωσή τους (48).

## **Smad-επαγόμενη καταστολή της μεταγραφής**

Στον υποκινητή του gooseoid οι Smad2 και FAST1 συνεργάζονται για την ενεργοποίηση του γονιδίου, ενώ η Smad3 αναστέλλει την ενεργοποίηση αυτή. Η διαφορά ανάμεσα στις Smad2 και Smad3, βρίσκεται στην ικανότητα πρόσδεσης της δεύτερης δίπλα στην FAST θέση.

Η πρόσδεση των Ski και SnoN στις Smad2 ή Smad3, καταστέλλει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων των Smads και μλοκάρει την ανασταλτική επίδραση του TGF-β στην αύξηση των κυττάρων. Καθώς αυτοί οι συνκαταστολείς προσελκύνονται σε γονίδια που ενεργοποιούνται από τον TGF-β, είναι πιθανό η επαγωγή αυτής της γονιδιακής ενεργοποίησης να είναι το αποτέλεσμα της εξισορρόπησης της δράσης ενεργοποιητών όπως οι p300/CBP, ή καταστολέων όπως οι Ski και SnoN. Έχει, επίσης, παρατηρηθεί η περίπτωση μεταγραφικής καταστολής μέσω αλληλεπίδρασης των Smad με πρωτεΐνες που τις εμποδίζουν να έρθουν σε επαφή με την ρυθμιστική περιοχή των γονιδίων στόχων (π.χ. Evi 1- Smad3) (24).

## **Οι Smad πρωτεΐνες ως μεταγραφικοί συν-ρυθμιστές**

Όπως αναφέρθηκε, οι Smad αλληλεπιδρούν με πλήθος πυρηνικών παραγόντων. Η φύση αυτών των αλληλεπιδράσεων φαίνεται να είναι αποφασιστική για τη θετική ή αρνητική ρύθμιση της ενεργοποίησης των γονιδίων στόχων. Επομένως, οι Smad μπορούν να θεωρηθούν μεταγραφικοί συν-ρυθμιστές. Εξάλλου, (σε αντίθεση με τα FAST-ρυθμιζόμενα γονίδια), υπάρχουν πολλές περιπτώσεις που οι Smad δεν παρέχουν το πρωταρχικό σήμα, αλλά λειτουργούν ως δευτερεύον σήμα που τροποποιεί το αποτέλεσμα του πρωταρχικού, προσελκύνοντας επιπρόσθετους συνενεργοποιητές ή συνκαταστολείς στον υποκινητή. Υπό την έννοια αυτή, οι πρωτεΐνες Smad μπορεί να μην ξεκινούν ένα μεταγραφικό πρόγραμμα, αλλά να λειτουργούν ως συν-ρυθμιστές προϋπάρχοντος προτύπου γονιδιακής έκφρασης.

**Σχέση των πρωτεϊνών Smad με στοιχεία του κυτταροσκελετού.**

Πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν την σύνδεση των Smad με τους μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού. Η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να συντελεί στην διατήρηση των Smad πρωτεϊνών σε ανενεργή μορφή. Ο τρόπος με τον οποίο το σήμα από τους μεμβρανικούς υποδοχείς μεταβαίνει, στις ακινητοποιημένες στο κυτταρόπλασμα (σύμφωνα με το προαναφερθέν μοντέλο) Smad, ώστε να τις ενεργοποιήσει, δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί (49).

### **Ο ρόλος των Smad πρωτεϊνών στη ογκοκαταστολή και την επούλωση πληγών.**

Καθώς η υπερικογένεια του TGF- $\beta$  εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για συσχέτιση των μεταλλαγμένων μελών αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού με ανθρώπινες ασθένειες. Έτσι βρέθηκε ότι η DPC4 (Smad4) παρουσιάζει απώλεια ετεροζυγωτίας, τουλάχιστον στο 50% των καρκίνων του παγκρέατος, ενώ μεταλλάξεις της Smad2 σχετίζονται με μικρό αλλά σημαντικό αριθμό περιπτώσεων καρκίνου του εντέρου. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι οι πρωτεΐνες Smad μπορεί να δρουν και ως ογκοκαταστολείς (50).

Μελέτες που έγιναν σε ποντικούς ελλειμματικούς της Smad3, έδειξαν ότι στα ποντίκια αυτά παρατηρείται επιτάχυνση του ρυθμού επούλωσης των πληγών, σε σχέση με τα ποντίκια αγρίου τύπου, η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση του ρυθμού επανα-επιθηλιοποίησης και μείωση της τοπικής διείσδυσης μονοκυττάρων. Η έλλειψη της Smad3 ισοδυναμεί με μιτωτικό σήμα για τα κερατινοκύτταρα, που διαιρούμενα συντελούν στη γρήγορη επούλωση των πληγών. Βεβαίως, τα αντιμιτωτικά σήματα που επάγονται από την Smad3 μπορεί να είναι σημαντικά ενάντια στην καρκινογένεση. Για το λόγο αυτό, εφόσον η έλλειψη της Smad3 έχει τις ίδιες επιπτώσεις στον άνθρωπο και στον ποντικό και εφ' όσον γρηγορότερη επούλωση σημαίνει και καλύτερη επούλωση χωρίς τον κίνδυνο καρκινογένεσης, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αναστολείς της Smad3, τοπικά σε εκτεταμένα τραύματα (51,52).



## ΥΛΙΚΑ

### **Κατασκευή πλασμιδίων.**

Τα πλασμίδια pSG5LMP1-FLAG, pcDNA3LMP1-FLAG, pcDNA3LMP1 (1-231)-FLAG, pcDNA3LMP1(Δ188-351)-FLAG, pSG5LMP1AAA, pSG5LMP1Y384G, pSG5LMP1ΔC, pSG5LMP1D1, pcDNA3TRAF2-FLAG, pcDNA3TRAF2ΔRF, pCMVikBDN, pcDNA3NIK-FLAG, pcDNA3NIKDN, pcDNA3IKKβΔ9-FLAG, pcDNA3IKKβΔ34-FLAG και το υβριδικό πλασμίδιο pRCCMVp50/p65, αποτελούν ευγενική προσφορά του Δρ. Γ. Μόσιαλου. Τα πλασμίδια pRCCMVp65, pGEx2tp65ΔC και pGEx2Tp50 χορηγήθηκαν ευγενώς από τον Δρ. Δ. Θάνο, ενώ τα πλασμίδια pRCCMVp50 και pRCCMVp65ΔC από τον Δρ. Γ. Μαυροθαλασσίτη.

Τα ένζυμα περιορισμού, τα ρυθμιστικά τους διαλύματα και οι DNA πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή των πλασμιδίων, αγοράστηκαν από τις εταιρείες Gibco-BRL, New England Biolabs και Minotech. Τα δεόξυνουκλεοτίδια (dNTPs) που χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCRs) αγοράστηκαν από την Pharmacia, ενώ τα ολιγονουκλεοτίδια από το εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) και την Gibco-BRL. Για την κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών Smad χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pcDNAIamp της Invitrogen. Η Rnase A και η λυσοζύμη αγοράστηκαν από τη Sigma. Ο δείκτης μοριακού βάρους λ Bst E II κατασκευάστηκε ύστερα από πέψη του DNA του λ βακτηριοφάγου που αγοράστηκε από τη New England Biolabs. Το θρεπτικά υλικό που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες βακτηρίων LB περιείχε bacto-agar, bacto-tryptone yeast extract της εταιρείας Difco. Η αгарόζη αγοράστηκε από την εταιρεία EMS, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και διάφορα χημικά των εταιρειών Merck και Sigma καθώς και άλλων εμπορικών πηγών. Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγάλης κλίμακας βακτηριακή καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε το Plasmid Kit της εταιρείας Qiagen. Για την απομόνωση τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε το QIAquick Gel Extraction kit της ίδιας εταιρείας.

**Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών, παροδικές επιμολύνσεις, δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης (β-gal assay), μέτρηση δραστηριότητας λουσιφεράσης (Luciferase assay), μεταφορά πρωτεϊνών (Western blotting), ανοσοκατακρήμνιση (CoIp, pull down).**

Το θρεπτικό υλικό Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM), ο ορός Fetal Bovine Serum (FBS), το ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS), το ένζυμο Trypsin - EDTA καθώς και τα αντιβιοτικά Πενικιλίνη - Στρεπτομυκίνη αγοράστηκαν από την Gibco-BRL. Ο μετασηματίζων αυξητικός παράγοντας β1 (TGF-β1), που αποτελεί τον συνδέτη (ligand) των αντίστοιχων υποδοχέων TGF-βRI και TGF-βRII, αγοράστηκε από την εταιρεία R & D Systems. Ο ο-νιτροφαινυλογαλακτοπυρανοζίτης (ONPG), που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης, αγοράστηκε από τη Sigma. Το υπόσρωμα για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης αγοράστηκε από την εταιρεία Promega. Τα μονοκλωνικά αντισώματα από ποντικό anti-myc (9E10) και anti-Flag M2 αγοράστηκαν από την Sigma, όπως και τα δευτερεύοντα goat anti-mouse και anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated (HRP) αντισώματα. Τα πολυκλωνικά αντισώματα λαγού p65 και p50 αγοράστηκαν από την Santa Cruz. Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης (Glutathione Sepharose, GST beads), πρωτεΐνης A και πρωτεΐνης G, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοκατακρήμνιση, αγοράστηκαν από την εταιρεία Pharmacia Biotech. Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης Protran αγοράστηκαν από την εταιρεία Schleicher & Schuell. Για την αυτοραδιογραφία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL) και υπερευαίσθητο σύστημα ανοσοαποτύπωσης (ECL-hyperfilm) της εταιρείας Amersham Pharmacia Biotech.

## **ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel).**

Για τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης 1% και 0,5% (παρασκευαστικό gel). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής :

Σε κωνική φιάλη των 200 ml φέρονται 100ml TAE 1x (50xTAE : 2M Tris HCl pH 7.5, 2mM EDTA, οξικό οξύ για ρύθμιση του pH) και 1 gr αγαρόζης. Το μείγμα βράζεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη, αφήνεται να κρυώσει, οπότε και προστίθενται

4μl βρωμιούχου αιθιδίου (χρωστική για το DNA), και εκχύνεται σε ειδικό εκμαγείο. Αφού το πήκτωμα στερεοποιηθεί, φέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 1x TAE ως ρυθμιστικό διάλυμα - φορέα της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100 Volt, ενώ για την απομόνωση τμήματος DNA από παρασκευαστικό gel γίνεται στα 50 Volt.

#### **Απομόνωση τμημάτων DNA.**

Οι πλασμιδιακοί φορείς (vectors) και τα ενθέματα (inserts), τα οποία προκύπτουν ύστερα από πέψεις με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, ηλεκτροφορούνται σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης, όπως περιγράφεται παραπάνω, και οι ζώνες αφαιρούνται από το πήκτωμα με τη βοήθεια χειρουργικής λεπίδας. Ακολούθως, οι ζώνες τοποθετούνται σε κολώνες του QIAquick Gel Extraction Kit της Qiagen, οπότε ακολουθείται η προτεινόμενη από την κατασκευάστρια εταιρεία, πειραματική διαδικασία.

#### **Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction).**

Οι αντιδράσεις σύνδεσης έγιναν σε τελικό όγκο 10μl ή 20μl. Το συνολικό DNA κυμαινόταν στα 200 ng. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε το DNA του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος, ένζυμο T4 DNA ligase και 1x του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος.

#### **Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH10B της *E.coli* (transformation).**

Σε βακτηριολογικό σωλήνα φέρονται 100μl βακτηριακών κυττάρων DH10B (κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν, competent cells) και τα 10 μl ή 20 μl της αντίδρασης σύνδεσης ή του πλασμιδίου που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Το μείγμα αφήνεται στον πάγο για 30 min. Κατόπιν υφίσταται θερμικό σοκ στους 42<sup>0</sup> C για 45 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, στο μείγμα προστίθεται 1 ml θρεπτικού LB (LB : 1% bacto tryptone, 0.5% bacto yeast extract, 1%NaCl). Το τρυβλίο Perti με θρεπτικό LB -άγαρ και αντιβιοτικό αμικικιλίνη (50 μg/ml), όπου θα αναπτυχθεί η καλλιέργεια, έχει ήδη τοποθετηθεί σε επωαστήρα 37<sup>0</sup> C για να αποκτήσει την κατάλληλη θερμοκρασία. Τα 100 μl καλλιέργειας απλώνονται στο τρυβλίο με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου. Ακολουθεί επώαση στους 37<sup>0</sup> C για 16 - 18 ώρες (overnight).

### **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (miniprep procedure - micro screening).**

Κάθε αποικία λαμβάνεται από το τρυβλίο με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και καλλιεργείται σε 2 ml LB-ampicillin, για 16 -18 ώρες, στους 37<sup>0</sup> C υπό συνεχή ανάδευση. Από κάθε καλλιέργεια λαμβάνεται 1ml, φυγοκεντρείται σε 14000 rpm για 2 min, σε θερμοκρασία δωματίου και αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο με πιπέττα Pasteur υπό κενό, το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 600μl διαλύματος λύσης (lysis buffer : 8% sucrose, 5% Triton-100x, 500mMEDTA pH8.0, 50mM Tris-HCl pH 7.5). Κατόπιν στα κύτταρα προστίθενται 20 μl λυσοζύμης (10 mg/ml) και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολουθεί βρασμός για 90 δευτερόλεπτα και μεταφορά των δειγμάτων σε πάγο. Το αποτέλεσμα της προαναφερθείσας διαδικασίας είναι η παραμονή του πλασμιδιακού DNA εν διαλύσει, ενώ οι μεμβράνες, οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA του βακτηριακού κυττάρου είναι δυνατό να κατακρημνιστούν. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 14000 rpm για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα (debris) απομακρύνεται με οδοντογλυφίδα, και το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με 600 μl παγωμένης ισοπροπανόλης. Τα δείγματα αφήνονται στους -20<sup>0</sup> C, για 20 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 14000 rpm επί 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA κατακρημνίζεται ως ίζημα, εκπλένεται με 700 μl 75% αιθανόλης και φυγοκεντρείται στις 14000 rpm επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την αναρρόφηση της αλκοόλης, τα δείγματα ξηραίνονται υπό κενό και το DNA επαναδιαλύεται σε 30 μl αποστειρωμένου nanopure νερού.

### **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale preparation).**

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν κολώνες Qiagen (Qiagen- tip 500), βάσει των οδηγιών της κατασκευάστριας εταιρείας. Το πλασμιδιακό DNA επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8). Η συγκέντρωσή του μετράται με φωτομέτρηση στα 260 nm, ενώ η ποιότητά του εκτιμάται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

### **Πλασμιδιακές κατασκευές (plasmid constructions).**

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα πλασμίδια :

Πλασμίδια αναφοράς (Reporter plasmids) : p3x KBL, p12x CAGA luc,

Πλασμίδια συμπλήρωσης : (Fill-up plasmids, empty vectors) : pBS (pBluescript SK+), pUC19 (New England Biolabs),

Πλασμίδια έκφρασης (Expression vectors) : CA-Alk-5, pcDNAIampSmad3, pcDNAIampSmad3myc, pcDNAIampSmad4myc, pcDNAIampSmad3Flag, pcDNAIampSmad4Flag, pSG5LMP1-FLAG, pcDNA3LMP1-FLAG, pcDNA3LMP1(1-231)-FLAG, pcDNA3LMP1(Δ188-351)-FLAG, pSG5LMP1AAA, pSG5LMP1Y384G, pSG5LMP1ΔC, pSG5LMP1D1, pcDNA3TRAF2-FLAG, pcDNA3TRAF2ΔRF, pCMVikBDN, pcDNA3NIK-FLAG, pcDNA3NIKDN, pcDNA3IKKβΔ9-FLAG, pcDNA3IKKβΔ34-FLAG, pRCCMVp65, pRCCMVp65ΔC, pRCCMVp50, pRCCMVp50/p65, pGEx2tp65ΔC και pGEx2Tp50.

Για τη δομική και λειτουργική ανάλυση του μεταγραφικού παράγοντα Smad3 κατασκευάστηκαν 8 μεταλλαγμένες μορφές του. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν - με εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) - 8 διαφορετικά πλασμίδια που χαρακτηρίζονται από ελλείμματα στο αμινοτερματικό, στο καρβοξυτελικό άκρο, ή και στα δύο άκρα του Smad3. [Η δομή του αγρίου τύπου (wt) καθώς και των μεταλλαγμένων μορφών (deletions) του Smad3 απεικονίζονται στην Εικόνα , Στο σχήμα εικονίζεται και ο επίτοπος 6x myc στο αμινοτερματικό άκρο του wt Smad3 και των μεταλλαγμένων μορφών του].

Σαν εκμαγείο για την PCR χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pcDNAIampSmad3. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι :

1N-Smad3-myc : 5' CTGGAATTCATGTCGTCCATCCTGCCTTTCACCTC 3'  
58N-Smad3-myc : 5' CTGGAATTCCAGAACGTCAACACCAAGTGCATC 3'  
121N-Smad3-myc : 5' CTGGAATTCTGCGTGAATCCCTACCACTACCAG 3'  
247N-Smad3-myc : 5' CTGGAATTCACATTCCACGCCTCGCAGCCATCC 3'  
425C-Smad3 : 5' AATGCGGCCGCCTAAGACACACTGGAACAGCGGAT 3'  
374C-Smad3 : 5' AATGCGGCCGCCTACATGCGGATGGTGCACATTCG 3'  
290C-Smad3 : 5' AATGCGGCCGCCTAGATGTGTCTCCGTGTCAGCTC 3'  
248C-Smad3 : 5' AATGCGGCCGCCTAGAATGTCTCCCCGACGCGCTG 3'  
122C-Smad3 : 5' AATGCGGCCGCCTACACGCAGACCTCGTCCTTCTTCAT 3'

Όλες οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 50 μl, όπου περιέχονταν 1 ng από το πλασμίδιο εκμαγείο, 50 pmol από κάθε εκκινητή, 2 mM δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs),

1 U Vent πολυμεράσης και 1x του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου. Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο :

1. 94<sup>0</sup> C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα
2. 94<sup>0</sup> C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα
3. 62<sup>0</sup> C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα
4. 72 C για 2 λεπτά
5. 35 φορές επανάληψη των σταδίων 2-4
6. 4<sup>0</sup> C
7. Τέλος

Τα τμήματα 1-424, 1-122, 1-248, 1-290, 1-374, 59-424, 122-424, 248-424, και 59-290 του μορίου Smad3, ελήφθησαν μετά από πέψη των PCR προϊόντων με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και Not I. Σε αυτές τις θέσεις εντέθηκαν χωριστά στον φορέα pcDNAIampRbχmyc, ύστερα από την πέψη του με τα προαναφερθέντα ένζυμα περιορισμού. Τα πλασμίδια που προέκυψαν είναι τα εξής :

pcDNAIampSmad3myc(1-424),  
pcDNAIampSmad3myc(1-122),  
pcDNAIampSmad3myc(1-248),  
pcDNAIampSmad3myc(1-290),  
pcDNAIampSmad3myc(1-374),  
pcDNAIampSmad3myc(59-424),  
pcDNAIampSmad3myc(122-424),  
pcDNAIampSmad3myc(248-424),  
pcDNAIampSmad3myc(59-290)

### **Κυτταροκαλλιέργειες.**

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές COS-7 και HepG2 που προέρχονται από νεφρικά κύτταρα πιθήκου και κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φλάσκες 75 cm<sup>2</sup> και σε τρυβλία 6-well, p-60 και p-100 (διαμέτρου 6, 60 και 100 mm αντίστοιχα), σε επωαστήρα 37 C<sup>0</sup> και σε συνθήκες 5% CO<sub>2</sub> . Αποθέματα καλλιιεργειών (stocks) φυλάσσονται σε θερμοκρασία -80<sup>0</sup> C σε θρεπτικό DMEM με 10% FBS και 10% DMSO. Τα κυτταρικά δείγματα εμβαπίζονται σε υδατόλουτρο ώστε να ξεπαγώσουν και μεταφέρονται σε

φλάσκες με πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο ανανεώνεται την επόμενη μέρα προκειμένου να αποφευχθούν τυχούσες βλαβερές επιπτώσεις του DMSO. Το θρεπτικό υλικό στις φλάσκες ανανεώνεται κάθε 48-72 ώρες. Τα κύτταρα αραιώνονται (split) όταν σχηματίσουν μονοστιβάδα, με χρήση διαλύματος τρυψίνης (trypsin-EDTA), και στην κατάλληλη συγκέντρωση με προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού (τελική αραιώση στις φλάσκες 1:10).

### **Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections).**

Οι παροδικές επιμολύνσεις έγιναν με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  με τα εκάστοτε κατάλληλα και επιθυμητά πλασμίδια. Τα COS-7 αραιώνονται σε  $2.5 \times 10^5$  κύτταρα ανά well και σε  $5 \times 10^5$  κύτταρα ανά τρυβλίο p60 και p100, ενώ τα HepG2 σε διπλάσιες ποσότητες αντίστοιχα, την προηγούμενη μέρα της επιμόλυνσης. Τα κύτταρα μετρώνται με αιμοκυττόμετρο Neubauer, της εταιρείας Hauser Scientific. Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε 6-well (χρησιμοποιούνται στο luciferase assay) παρασκευάζεται μείγμα που περιέχει 2  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου αναφοράς, 6  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου έκφρασης ή/και πλασμιδίου συμπλήρωσης, 2  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, 31  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  2M και 195  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O for injections). Η ποσότητα του συνολικού DNA δεν υπερβαίνει τα 10  $\mu\text{g}$ .

Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε τρυβλίο p-100 (χρησιμοποιούνται για έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης, Western blotting) το μείγμα περιέχει μέχρι 17  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου έκφρασης, 31  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  2M και ποσότητα ddH<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250  $\mu\text{l}$ .

Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε τρυβλίο p-60 (χρησιμοποιούνται για έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης), το μείγμα περιέχει 5  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου έκφρασης και 5  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου συμπλήρωσης, 31  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  2M και ποσότητα ddH<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250  $\mu\text{l}$ .

Σε κάθε περίπτωση, το μείγμα προστίθεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση σε ίσο όγκο HEPES Buffered Saline (HBS) (2x HBS: 42 mM HEPES pH 7.1, 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 12 mM dextrose). Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, για να προστεθεί ακολούθως στάγδην στο τρυβλίο με τα κύτταρα. Στην περίπτωση συγκατακρήμνισης σε 6-well, κάθε δείγμα μοιράζεται ισόποσα σε δύο wells. Ακολουθεί επώαση στους 37<sup>0</sup> C για 16 ώρες, αλλαγή θρεπτικού και επώαση για άλλες 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκκλένονται με PBS και συλλέγονται σε 300  $\mu\text{l}$  διαλύματος λύσης (lysis buffer)-στην

περίπτωση των πειραμάτων σε 6-wells- είτε σε 1 ml PBS -στην περίπτωση των πειραμάτων σε τρυβλία p-100 ή p-60. Στην πρώτη περίπτωση, οι κυτταρικές μεμβράνες κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη δεύτερη περίπτωση, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 5 min στους 4<sup>0</sup> C, και επαναδιάλυση σε μικρότερο όγκο PBS (100-200 μl). Σε κάθε περίπτωση, τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -80<sup>0</sup> C.

### **Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal.**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, καθώς και για την εξάλειψη του σφάλματος λόγω του διαφορετικού αριθμού κυττάρων κάθε τρυβλίου, σε πειράματα μέτρησης της αντίδρασης της λουσιφεράσης. Για τον σκοπό αυτό το μείγμα συγκατακρήμνισης (βλ. παραπάνω) περιέχει και πλασμίδιο-φορέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης υπό τον υποκινητή του Cytomegalovirus (πλασμίδιο pCMVβ-gal) ή του γονιδίου PGK (Phospho-Glycerate Kinase) (πλασμίδιο pGKβ-gal). Σε 20 μl κυτταρικού εκχυλίσματος προστίθενται 456 μl Sodium Phosphate buffer (0.1M pH 7.3), 132 μl ONPG (8 mg/ml σε 0.1 M Sodium Phosphate buffer), και 6 μl 100x salt (3M KCl, 1M MgCl<sub>2</sub>, β-μερκαπτοαιθανόλη, dd H<sub>2</sub>O, τελικός όγκος 1ml). Τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο 37<sup>0</sup> C μέχρι να κιτρινίσουν. Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 200 μl διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M που προκαλεί μεταβολή του pH. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων γίνεται σε φωτόμετρο στα 410 nm. Η μεγαλύτερη τιμή που λαμβάνεται ανά πείραμα διαιρείται με τις υπόλοιπες, οπότε προκύπτει για κάθε τρυβλίο ο παράγοντας κανονικοποίησης ο οποίος αντιστοιχεί στην ποσότητα δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί στη μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης.

### **Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay).**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον υποκινητή του πλασμιδίου αναφοράς, ως αποτέλεσμα της επιμόλυνσης με πλασμίδια έκφρασης. Η εκτίμηση αυτή γίνεται με χρήση ενζυμικής αντίδρασης, όπου μετράται η δραστικότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης που προέρχεται από την πυγολαμπίδα (fire fly) και που, επίσης, εκφράζεται στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιείται ποσότητα κυτταρικού εκχυλίσματος που αντιστοιχεί στον παράγοντα κανονικοποίησης, και 100 μl υποστρώματος



λουσιφεράσης. Η τιμή της μεταγραφικής ενεργοποίησης κάθε δείγματος δίνεται από το λουμινόμετρο (Illuminometer).

### **Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης (Western Blot).**

Τρες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί, υπόκεινται σε SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 8.5% ή 12.5% [Stacking gel: ddH<sub>2</sub>O 1.8 ml, 30% acrylamide 0.45 ml, stacking buffer (Tris 0.5 M, SDS 0.4%, pH 6.8) 0.75 ml, 10% APS 30 μl, TEMED 3 μl. Running gel: ddH<sub>2</sub>O 2.3/1.6 ml, 30% acrylamide 1.4/2.1 ml, running buffer (Tris 1.5 M, SDS 0.4%, pH 8.8) 1.25 ml, 10% APS 80 μl, TEMED 4 μl]. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε 500 ml διαλύματος 1x TGS (1L 10x TGS : 30.3 grTris, 144.2 gr Glycine, 10 gr SDS, pH 8.3), στα 200 Volt και με χρήση της συσκευής Bio-Rad Protean electroblot. Η ίδια συσκευή χρησιμοποιήθηκε και για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβάνες νιτροκυτταρίνης. Ακολουθεί χρώση των πρωτεϊνών με χρωστική Poinceau, έκπλυση με διάλυμα TBS-T [1x TBS, 0.05% Tween-20] [1 L 10x TBS: 90 gr NaCl, 250 ml Tris-HCl 2M pH 7.3] για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών μπλοκάρονται με εκπλύσεις με διάλυμα TBB [1x TBS, 5% ημιαποβουτηρωμένο γάλα, 0.05% Tween-20] 3 φορές, 10 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επωάζονται για 1 ώρα με το αντίσωμα, που ανιχνεύει τον επιθυμητό επίτοπο ή την πρωτεΐνη, σε κατάλληλη αραιώση σε διάλυμα TBB. Ακολούθως, οι μεμβράνες εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα TBS-T, 10 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση των μεμβρανών σε κατάλληλο, αραιωμένο 1: 10000 σε TBS-T, δευτερεύον αντίσωμα HRP, γίνεται και πάλι για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν γίνονται 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μία με TBS-T, και 1 έκπλυση των 5 λεπτών σε TBS, όλες σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL Western blotting kit) και εκθέτοντας τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης σε ECL-hyperfilm για διάφορα χρονικά διαστήματα.

Οι μεμβράνες μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για εκ νέου ανίχνευση διαφορετικού επίτοπου, αφού υποβληθούν σε διαδικασία stripping, με χρήση κατάλληλου διαλύματος (Stripping buffer : 100 mM2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) και επώαση στους 50<sup>0</sup> C για 30 λεπτά, με παροδική ανάδευση. Ακολουθούν εκπλύσεις και επώσεις των μεμβρανών, όπως περιγράφεται παραπάνω.

### **Καθαρισμός πρωτεϊνών που φέρουν τον επίτοπο GST, από κύτταρα *E.coli*.**

Μετά τον μετασχηματισμό κυτταρών DH10B της *E.coli* με το πλασμίδιο έκφρασης GST-protein, επιμολύνονται, με μία μόνο αποικία, 25 ml καλλιέργειας LB/ampicillin. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37<sup>0</sup> C overnight, και την επόμενη μέρα μεταφέρεται σε καλλιέργεια 200 ml LB/ampicillin. Ακολουθεί επώαση στους 37<sup>0</sup> C μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD), που μετράται στα 600 nm, να φτάσει στο 0.6-0.8. Κατόπιν προστίθεται ο παράγοντας επαγωγής της πρωτεϊνικής έκφρασης IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.1 mM, και η καλλιέργεια επωάζεται στους 30<sup>0</sup> C - ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης - για 4-5 ώρες ακόμα. Στη συνέχεια, η φλάσκα με την καλλιέργεια παγώνεται για 5 λεπτά στους 4<sup>0</sup> C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 10 λεπτά στους 4<sup>0</sup> C, και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 50 ml παγωμένου PBS. Το εναιώρημα υφίσταται sonication 6 φορές επί 15 δευτερόλεπτα, με ενδιάμεσα διαλλείματα των 30 δευτερολέπτων, μέχρι να καταστεί διαυγές, ενώ η όλη διεργασία γίνεται κρατώντας τα δείγματα σε πάγο. Κατόπιν προστίθενται 2.5 ml 20% Triton-X-100, τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται στους 4<sup>0</sup> C για 30 λεπτά και φυγοκεντρώνονται στις 10000 rpm για 10 λεπτά στους 4<sup>0</sup> C. Στο υπερκείμενο προστίθενται 250 μl 50% σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, εξισορροπημένων σε PBS. Τα δείγματα αφήνονται σε περιστροφή, overnight στους 4<sup>0</sup> C. Το επόμενο πρωί φυγοκεντρώνονται στις 2000 rpm για 5 λεπτά, στους 4<sup>0</sup> C. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια υφίστανται για 3 φορές την ακόλουθη διαδικασία : έκπλυση με 25 ml παγωμένου PBS/1% Triton, περιστροφή για 5 λεπτά στους 4<sup>0</sup> C, και φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 λεπτά, στους 4<sup>0</sup> C. Μετά την τελευταία έκπλυση, στα σφαιρίδια προστίθεται 1 ml PBS, και ύστερα από στιγμιαία φυγοκέντρηση και απόρριψη του υπερκειμένου, στα σφαιρίδια προστίθενται 250μl PBS. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους 4<sup>0</sup> C. Σε 10-20 μl δείγματος προστίθεται ίσος όγκος 2x SDS Loading Buffer, και μετά από βρασμό για 5 λεπτών, αναλύεται η έκφραση της GST-protein σε 8.5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα βάφεται με χρωστική Commasie, που καθιστά ορατές τις πρωτεΐνες.

### ***In vitro* αλληλεπίδραση πρωτεϊνών (pull-down).**

Μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας επιμόλυνσης COS-7 κυττάρων με πλασμίδιο έκφρασης έστω μιας πρωτεΐνης A, την αλλαγή του θρεπτικού, τις εκπλύσεις με PBS, την αποκόλληση με ξύστρο και τη φυγοκέντρηση (βλ. παραπάνω), τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 200 μl WCE (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 400 mM KCl, 10% Glycerol, και 2 mM DTT και πρωτεϊνικοί αναστολείς που προστίθενται λίγο πριν τη χρήση). Ακολουθεί διαδικασία παγώματος στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και ξεπαγώματος σε πάγο (freeze and thaw) για 3 φορές, έτσι ώστε να σπάσουν τα κύτταρα. Μετά την φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 5 λεπτά και την απομάκρυνση του debris, το υπερκείμενο φυλάσσεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Σε 100 μl αυτού του υπερκειμένου, προστίθενται 200 μl από GST-protein B (βλ. τρόπο παρασκευής παραπάνω) εξισορροπημένης σε 2x Interaction Buffer (40 mM Hepes pH 7.9, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4% NP40, 0.4% BSA, 15% Glycerol, 4 mM PMSF και αναστολείς της πρωτεόλυσης). Επίσης προστίθεται dd  $\text{H}_2\text{O}$ , ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 400 μl. Ακολουθεί περιστροφή για 1.5 ώρες στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκειμένου, γίνεται μία έκπλυση με διάλυμα 1 και μία με το διάλυμα 2 (Διαλύματα 1 και 2: 100 mM KCl και 250 mM KCl αντίστοιχα, 20 mM Hepes pH 7.9, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2% NP40, 4 mM PMSF, και αναστολείς της πρωτεόλυσης). Μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκειμένου, στα σφαιρίδια προστίθενται 100 μl 2x SDS Loading Buffer. Ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά και ανίχνευση της πρωτεΐνης A (ή του επίτοπου της, εάν φέρει) με ηλεκτροφόρηση σε 8.5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (βλ. παραπάνω).

### **Ανοσο-συνκατακρήμνιση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών (Co-Immunoprecipitation).**

Περίπου 32 ώρες μετά την επιμόλυνση κυττάρων COS-7 με πλασμιακό φορέα έκφρασης έστω των πρωτεϊνών 1 και 2, ακολουθεί έκπλυση με παγωμένο PBS διάλυμα, αναρρόφηση και προσθήκη 1 ml διαλύματος λύσης (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton-X-100, 10 μl/ml 100 mM PMSF και 10 μl αναστολέων της πρωτεόλυσης). Τα τρυβλία αφήνονται σε ανακινούμενη πλατφόρμα για 20 λεπτά. Κατόπιν, τα κύτταρα αποκολλώνται με ξύστρο, φυγοκεντρώνται στις 14000rpm για 3 λεπτά, στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Από το υπερκείμενο κρατείται ποσότητα 100 μl που θα χρησιμοποιηθεί στην πρωτεϊνική ανάλυση. Στη

συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστίθενται 50 μl 50% σφαιριδίων πρωτεΐνης A, που έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα PBS. Τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται για 30 λεπτά, στους 4<sup>0</sup> C. Ακολουθεί στιγμιαία φυγοκέντρηση και στο υπερκείμενο προστίθενται 30 μl αντισώματος της Santa Cruz ή 1 μl αντισώματος της Sigma, έναντι της πρωτεΐνης 1. Τα δείγματα επώάζονται για 2 ώρες σε ανακινούμενη πλατφόρμα, στους 4<sup>0</sup> C. Κατόπιν, σε κάθε δείγμα προστίθενται 50 μl 50% σφαιριδίων πρωτεΐνης G, που έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα PBS. Στα σφαιρίδια αυτά προσκολλώνται τα αντισώματα και συνεπώς και η πρωτεΐνη 1. Τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται για 30 λεπτά, στους 4<sup>0</sup> C. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με 1 ml παγωμένου διαλύματος λύσης και μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση, προσθήκη 50 μl 2x Sample Buffer. Μετά από βρασμό 5 λεπτών, αναλύεται η ηλεκτροφορητική ικανότητα των δειγμάτων σε 8.5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, και ανίχνευση της παρουσίας της πρωτεΐνης 2, με χρησιμοποίηση αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης 2 ή του επιτόπου της. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης 2 υποδηλώνει την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών 1 και 2.

### **Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence)**

Δεκαέξι ώρες μετά την επιμόλυνση κυττάρων σε p60 τρυβλίο, τα κύτταρα αποκολλώνται με χρήση τρυψίνης και αραιώνονται σε 6-well τρυβλίο. Σε κάθε well έχει προηγουμένως τοποθετηθεί αποστειρωμένη καλυπτρίδα 22 x 22 mm καλυμμένη με 500 μl/well 0.1% gelatin. Τα κύτταρα επώάζονται για άλλες 24 ώρες για να ακολουθήσει στη συνέχεια η διαδικασία ανοσοφθορισμού.

Τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές, για 3 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου και αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα, με 1.5 ml/well PBS<sup>+/+</sup> (PBS, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>). Ακολουθεί σταθεροποίηση των κυττάρων (fixing) με 1 ml/well διαλύματος 3% π-formaldehyde σε PBS<sup>+/+</sup>, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανακίνηση. Επαναλαμβάνεται το στάδιο της έκπλυσης για 2 ακόμα φορές με τον ίδιο τρόπο. Οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές, ώστε τα αντισώματα να περνούν στο εσωτερικό τους, με χρήση διαλύματος 1 ml/well 0.5% Triton-X-100 σε Buffer 1 (10x Buffer 1 : 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucose, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 20 mM MES, pH 6.0-6.5). Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε

θερμοκρασία δωματίου και χωρίς ανακίνηση. Επαναλαμβάνονται 2 εκπλύσεις όπως περιγράφονται παραπάνω, καθώς και 2 ακόμα με τον ίδιο τρόπο, αλλά σε διάλυμα 1.5 ml/well PBS+//1.5% FBS (χρησιμοποιείται για μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης αντισωμάτων). Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται με 50 μl πρωταρχικού αντισώματος, το οποίο αραιώνεται 1 : 200 σε διάλυμα PBS+//1.5% FBS. Η επώαση γίνεται στους 4<sup>0</sup> C, σε επίπεδη επιφάνεια για 30 λεπτά. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με τον τρόπο που έχει περιγραφεί και σε διάλυμα PBS+//1.5% FBS. Κατόπιν τα κύτταρα επωάζονται με 50 μl δευτερεύοντος αντισώματος IgG-FITC, το οποίο αραιώνεται 1: 50 σε διάλυμα PBS+//1.5% FBS. Η επώαση γίνεται στο σκοτάδι (καθώς το IgG-FITC είναι φωτοευαίσθητο), στους 4<sup>0</sup> C, σε επίπεδη επιφάνεια και για 30 λεπτά. Η περαιτέρω διεργασία πραγματοποιείται στο σκοτάδι. Γίνονται 2 εκπλύσεις με διάλυμα PBS+//1.5% FBS, και 2 ακόμα με διάλυμα PBS+//. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα αποκολλώνται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους, στις οποίες έχουν προστεθεί 7 μl διαλύματος μονιμοποίησης (Glycerol/PBS 1:1). Τα όρια επαφής καλυπτρίδας - αντικειμενοφόρου στεγανοποιούνται με Manot. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4 C<sup>0</sup> και σε σκοτάδι, ενώ η παρατήρησή τους γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού (Olympus BH-2) και η φωτογράφησή τους με 35 mm Olympus (C-35AD-4) camera.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Συναγωνισμός μεταξύ των μονοπατιών του TGF-β και της λανθάνουσας μεμβρανικής πρωτεΐνης 1 LMP1.

Η πρωτεΐνη LMP1 έχει δειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον μετασχηματισμό των κυττάρων από τον ιό EBV. Ο μηχανισμός με τον οποίο η πρωτεΐνη LMP1 προκαλεί μετασχηματισμό δεν είναι ακόμα γνωστός. Έχει προταθεί ότι η ενεργότητα μετασχηματισμού της πρωτεΐνης LMP1, οφείλεται στην απενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του μετασχηματίζοντος αυξητικού παράγοντα β (TGF-β). Για να μελετήσουμε την επίδραση της πρωτεΐνης LMP1 στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β, κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με ένα πλασμίδιο αναφοράς το οποίο αποτελείται από το γονίδιο της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας (firefly luciferase) υπό τον έλεγχο ενός συνθετικού υποκινητή, ο οποίος αποτελείται από 12 θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Smad3, σε σύντηξη με την ελάχιστη περιοχή του κύριου όψιμου υποκινητή του αδενοϊού (AdML minimal promoter). Όπως περιγράφηκε στην εισαγωγή, οι πρωτεΐνες Smad είναι οι κύριοι μεταγωγείς του σήματος του TGF-β στα ευκαρυωτικά κύτταρα και προσδέονται σε ρυθμιστικές περιοχές που περιλαμβάνουν την ακολουθία CAGA. Όπως έχει δειχθεί προηγουμένως, ο συνθετικός υποκινητής 12xCAGA ενεργοποιείται πολύ δραστικά από τον παράγοντα TGF-β. Πράγματι, επώαση κυττάρων COS-7, τα οποία επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο p12xCAGALuc, με τον παράγοντα TGF-β (400 pM) για 24 ώρες, προκάλεσε μια δραστική μεταγραφική ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή κατά 40 φορές, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 6**. Η συνέκφραση της πρωτεΐνης LMP1 προκάλεσε μια δραματική πτώση στην ενεργοποίηση του υποκινητή 12xCAGALuc από τον TGF-β κατά 8 φορές (500% σε σύγκριση με το 4000% απουσία του LMP1). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η πρωτεΐνη LMP1 δρα ως αναστολέας του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β στα κύτταρα COS-7.

Για να επιβεβαιώσουμε την παρατήρηση αυτή πραγματοποιήσαμε τις εξής αναλύσεις: κύτταρα COS-7 συνεπιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς 12xCAGALuc και ενός φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης CA-ALK5. Η πρωτεΐνη CA-ALK5 είναι ο υποδοχέας τυπού I του TGF-β, ο οποίος περιέχει μια σημειακή μετάλλαξη (αλλαγή της θρεονίνης 204 σε ασπαρτικό οξύ, T204D), η οποία τον καθιστά συστατικά ενεργοποιημένο ακόμα και απουσία του συνδέτη TGF-β. Η συνεπιμόλυνση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του 12xCAGA κατά 15

φορές. Η συνέκφραση της πρωτεΐνης LMP1 προκάλεσε πτώση της ενεργοποίησης του 12xCAGA από την CA-ALK5 κατά 12.5 φορές (120% σε σύγκριση με 1500% της CA-ALK5 απουσία LMP1). Τέλος, κύτταρα COS-7 συνεπιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p12xCAGAluc και φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4 του ανθρώπου, απουσία και παρουσία της πρωτεΐνης LMP1. Όπως δείχνεται στην **Εικόνα 6**, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4 αυξάνει τη δραστικότητα του 12xCAGA υποκινητή κατά 70 φορές, ενώ η ενεργοποίηση αυτή μειώθηκε κατά 35 φορές παρουσία της πρωτεΐνης LMP1.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 6** δείχνουν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης LMP1 στα κύτταρα COS-7 αναστέλλει σε σημαντικό βαθμό το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β, το οποίο επάγεται είτε με την προσθήκη εξωγενούς TGF-β, είτε με την έκφραση των πρωτεϊνών CA-ALK5 και Smad3/Smad4.

Για να ελέγξουμε εάν ισχύει το αντίστροφο, δηλαδή εάν το σηματοδοτικό μονοπάτι του LMP1 αναστέλλεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β, κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με ένα πλασμίδιο αναφοράς, το οποίο περιέχει το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο ενός συνθετικού υποκινητή που αποτελείται από 3 θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, και καλείται p3xKBL. Όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην εισαγωγή, το σηματοδοτικό μονοπάτι του LMP1 οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης NF-κB. Έτσι, η ενεργοποιημένη από την LMP1 NF-κB πρωτεΐνη αυξάνει την μεταγραφική ενεργότητα από τον συνθετικό υποκινητή p3xKBL. Πράγματι, η συνεπιμόλυνση των COS-7 κυττάρων με τον p3xKBL και το πλασμίδιο έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1, προκάλεσε δραματική αύξηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον p3xKBL κατά 20 φορές, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 7**. Η συνέκφραση της πρωτεΐνης CA-ALK5 προκάλεσε πτώση της ενεργοποίησης του υποκινητή από την LMP1 πρωτεΐνη κατά 2.5 φορές (750% σε σύγκριση με 2000% απουσία της CA-ALK5). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η πρωτεΐνη CA-ALK5 αναστέλλει μερικώς το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB που χρησιμοποιείται από την LMP1.

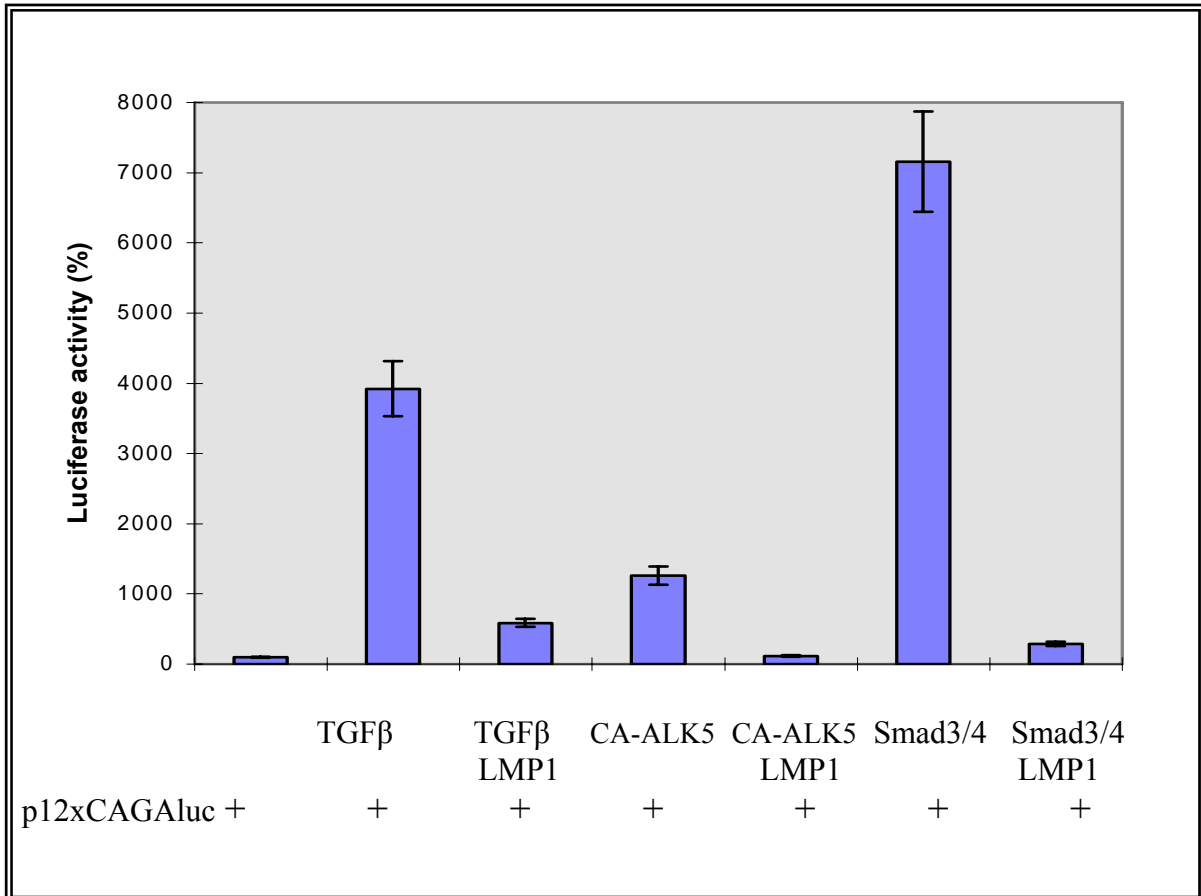
Για να επιβεβαιώσουμε την παρατήρηση, κύτταρα COS-7 συνεπιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p3xKBL και τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pcDNA1ampSmad3myc και pcDNA1ampSmad4myc. Το αποτέλεσμα της συνεπιμόλυνσης ήταν η ακόμα μεγαλύτερη πτώση της δραστικότητας του υποκινητή κατά 12.5 φορές (160% σε σύγκριση με την τιμή 2000% της ενεργοποίησης από την

LMP1 απουσία των Smad3 και Smad4). Οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4 φαίνεται να δρουν ανασταλτικά στην ενεργοποίηση του NF-κB. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 7** δείχνουν ότι η πρωτεΐνη CA-ALK5, καθώς και η πρωτεΐνη Smad3 σε συνεργασία με την Smad4, αναστέλλουν το μονοπάτι σηματοδότησης της πρωτεΐνης LMP1. Συνοπτικά από τις **Εικόνες 6 και 7** προκύπτει ότι, στα κύτταρα COS-7 υπάρχει ανταγωνισμός ανάμεσα στο μονοπάτι σηματοδότησης του παράγοντα TGF-β και του μονοπατιού που χρησιμοποιεί η πρωτεΐνη LMP1 προκειμένου να επάγει τον κυτταρικό μετασχηματισμό.

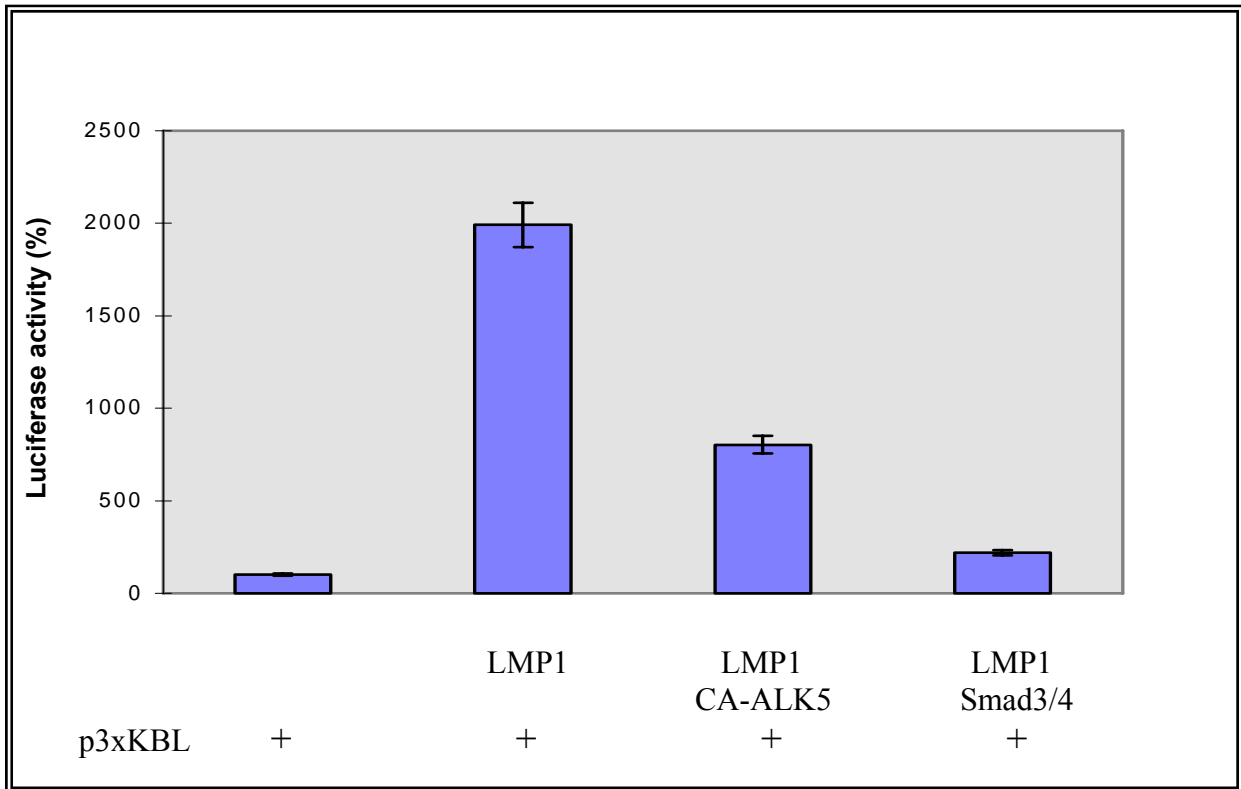
### **Περιοχές της πρωτεΐνης LMP1 που απαιτούνται για την αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β.**

Για να μελετήσουμε τις περιοχές του LMP1 μορίου, οι οποίες προκαλούν την αναστολή του μονοπατιού σηματοδότησης του TGF-β που παρατηρήθηκε στα προαναφερθέντα πειράματα, πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων COS-7 με φορείς έκφρασης μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης LMP1. Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα πλασμίδια έκφρασης: pcDNA3LMP1 (1-231)-FLAG, pcDNA3LMP1(Δ188-351)-FLAG, pSG5LMP1AAA, pSG5LMP1Y384G, pSG5LMP1ΔC, και pSG5LMP1D1. Η πρωτεΐνη LMP1(1-231) στερείται της περιοχής CTAR2 που επάγει κατά 75% (σε σχέση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη) ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (βλ. Εισαγωγή). Η πρωτεΐνη LMP1Δ188-351 χαρακτηρίζεται από έλλειμμα της CTAR2 και της περιοχής σύνδεσης ανάμεσα στις CTAR1 και CATR2. Η πρωτεΐνη LMP1AAA έχει τριπλή σημειακή μετάλλαξη των αμινοξέων προλίνη, γλουταμίνη και θρεονίνη (P<sup>204</sup>Q<sup>206</sup>T<sup>208</sup>) σε αλανίνες Η πρωτεΐνη LMP1Y384G χαρακτηρίζεται από μια σημειακή μετάλλαξη της τυροσίνης της θέσης 384, σε γλυκίνη. Η πρωτεΐνη LMP1ΔC στερείται ολόκληρης της καρβοξυτελικής περιοχής, και συνεπώς ενεργότητας επαγωγής του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, σύμφωνα με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε Β-λεμφοκύτταρα. Τέλος, η πρωτεΐνη pSG5LMP1D1, δεν έχει τις 4 πρώτες διαμεμβρανικές περιοχές, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να συναθροίζεται στην κυτταρική μεμβράνη με άλλες πρωτεΐνες, όπως έδειξαν μελέτες σε Β-λεμφοκύτταρα.. Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης LMP1 δίνεται στην **Εικόνα 8**.

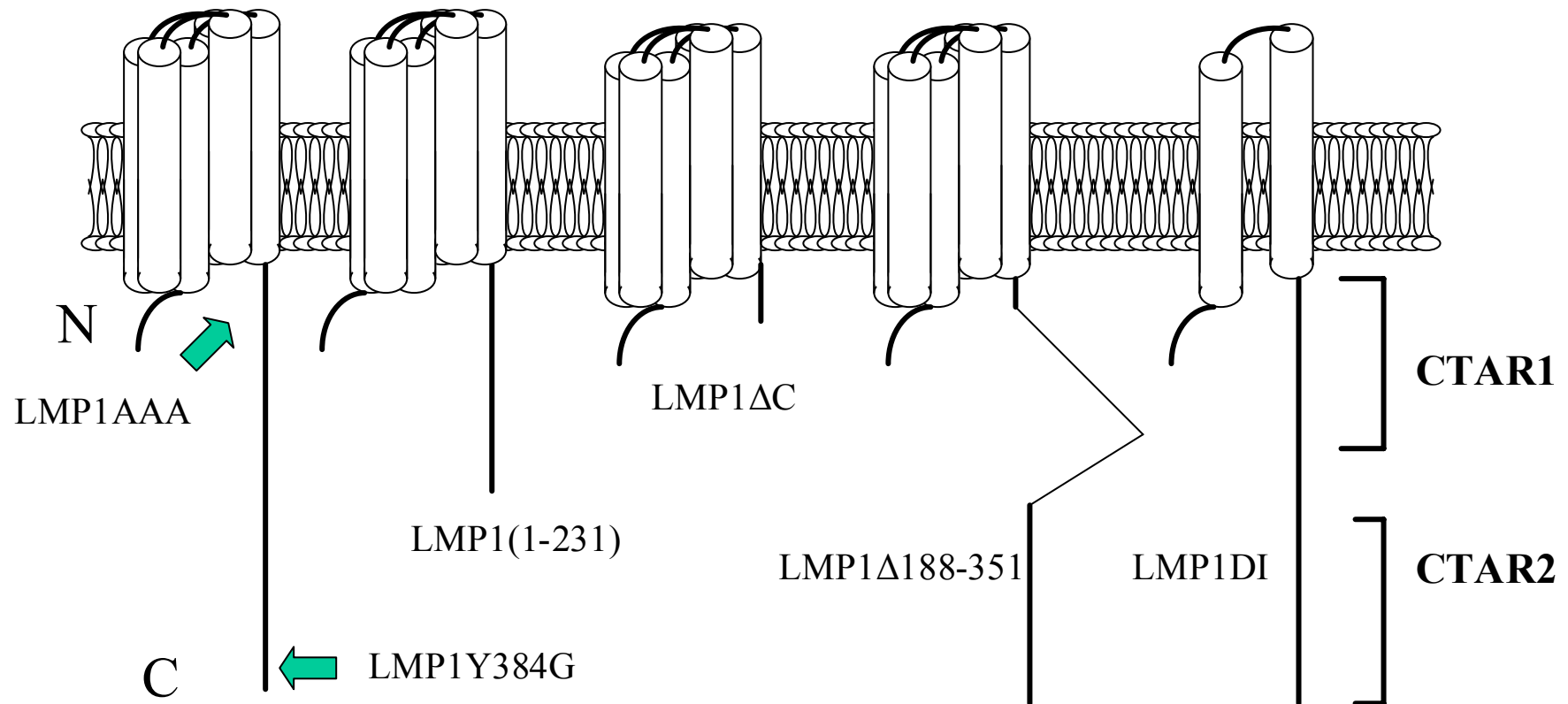




**Εικόνα 6.** Απενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β από την λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 1 (Latent Membrane Protein 1, LMP1). Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς 12xCAGAluc (2 μg), απουσία ή παρουσία TGF-β (400 pM) ή φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών LMP1 (2 μg), CA-ALK5 (2 μg), Smad3 (2 μg), και Smad4 (2 μg), όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η προσθήκη του TGF-β έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



**Εικόνα 7.** Η LMP1 χρησιμοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, το οποίο απενεργοποιείται από τον παράγοντα TGF-β. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p3xKBL (2 μg), απουσία ή παρουσία των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών LMP1 (2 μg), CA-ALK5 (2 μg), Smad3 (2 μg), και Smad4 (2 μg), όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

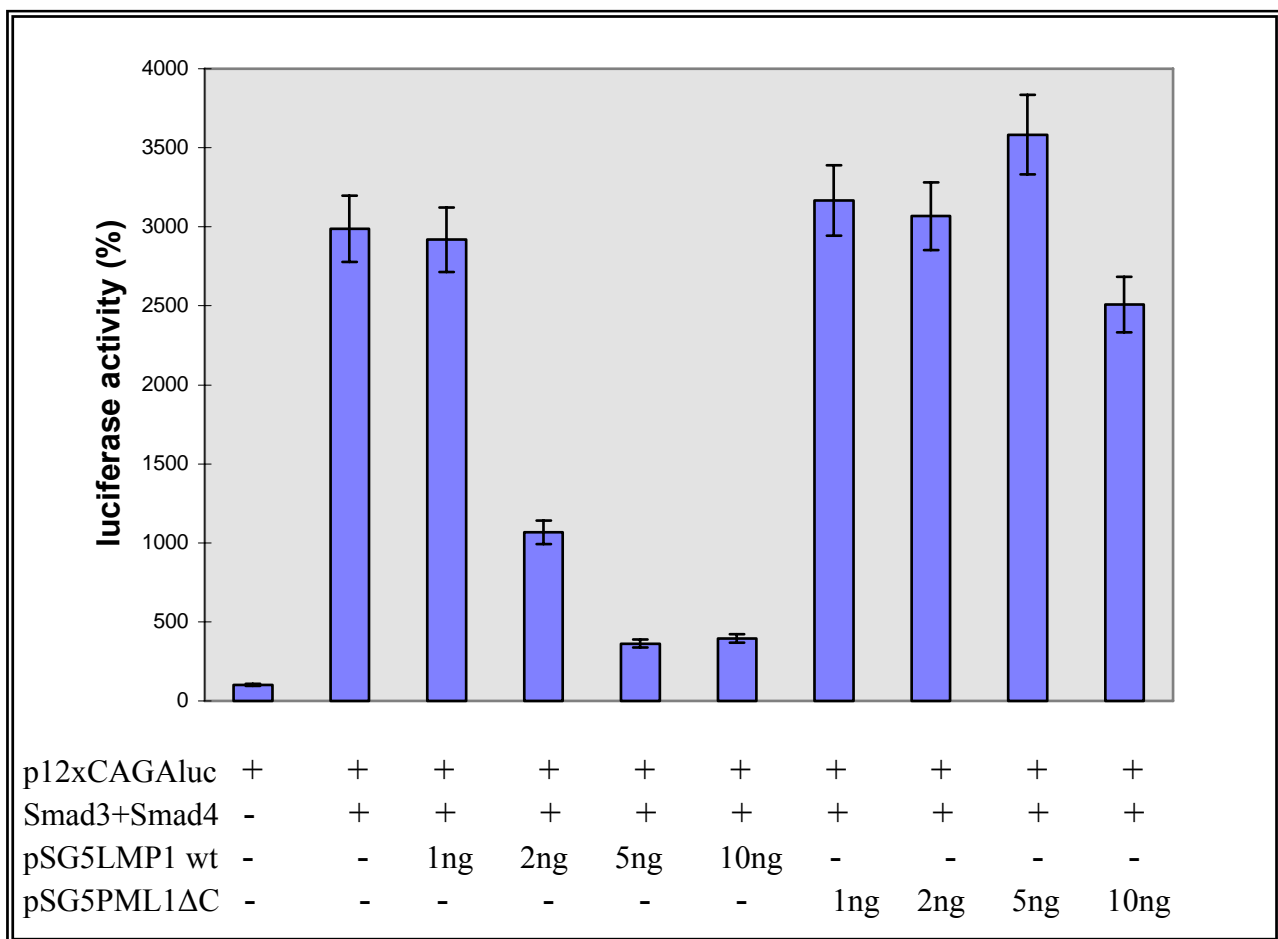


**Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλαγμένων μορφών της LMP1 που χρησιμοποιήθηκαν.** CTAR: C-terminal activation region, LMP1AAA: τριπλή μετάλλαξη των PQT των θέσεων 204, 206, και 208 σε A, LMP1Y384G: σημειακή μετάλλαξη, LMP1(1-231): περιέχει την CTAR1, LMP1Δ188-351: εσωτερική απαλοιφή, LMP1ΔC: έλλειμμα του C-τερματικού άκρου, LMP1DI: έλλειμμα των 4 πρώτων διαμεμβρανικών περιοχών.

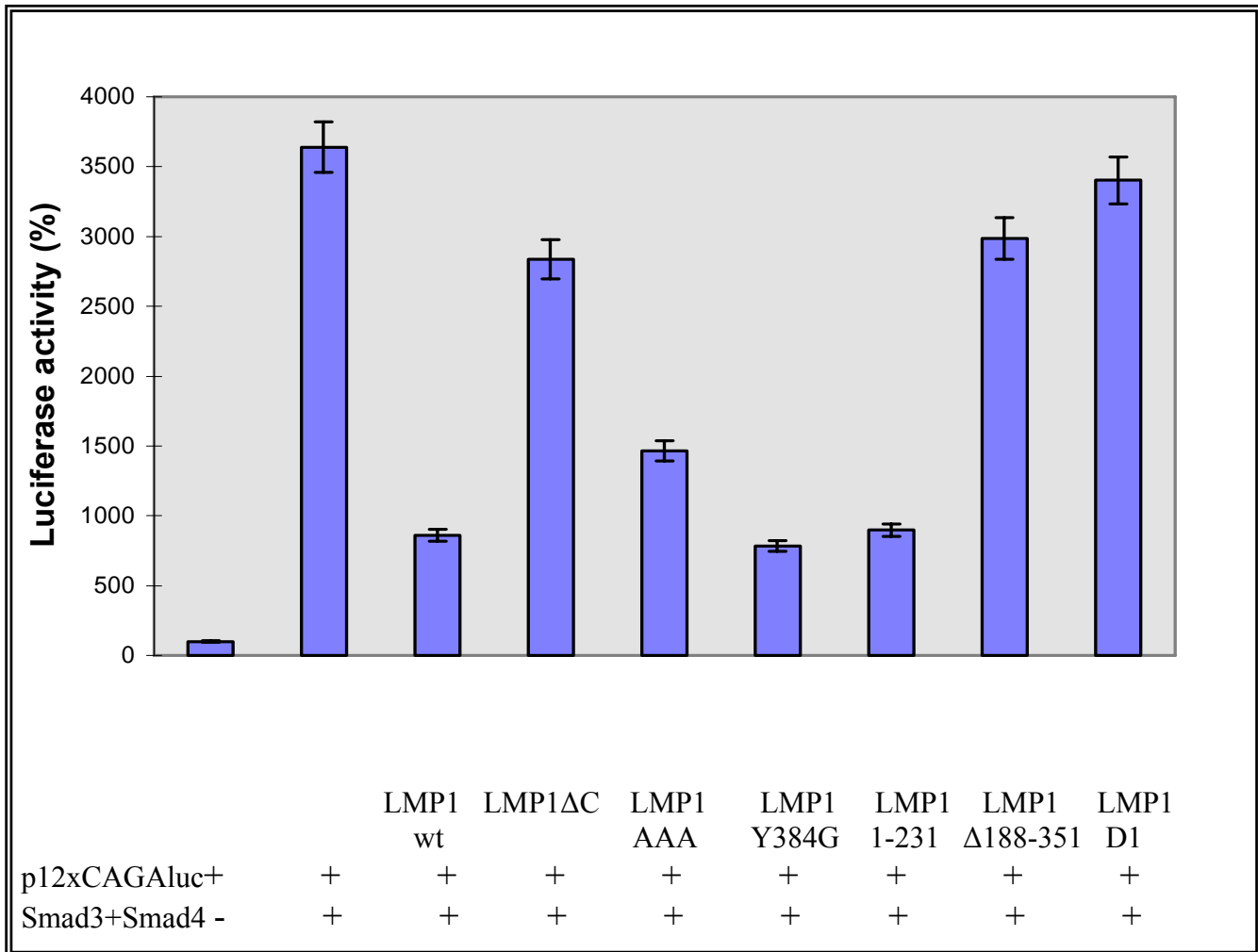
Πριν μελετηθεί η δράση των μεταλλαγμένων μορφών της LMP1 στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- $\beta$ , πραγματοποιήθηκε πείραμα τιτλοδότησης, με χρήση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φορέα έκφρασης της αγρίου τύπου LMP1 καθώς και της μεταλλαγμένης LMP1 $\Delta$ C. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς του 12xCAGAluc, τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4, και προοδευτικά αυξανόμενες ποσότητες των φορέων pSG5LMP1Flag και pSG5LMP1 $\Delta$ C. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 9**, οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4 προκαλούν δραματική αύξηση της δραστηριότητας του υποκινητή κατά 30 φορές. Ποσότητα 1 ng του φορέα έκφρασης της LMP1 προκαλεί πολύ μικρή πτώση στην ενεργότητα που προσδίδουν στον υποκινητή οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες (2900% σε σχέση με την 3000% ενεργότητα παρουσία μόνο των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4). Ποσότητα 2 ng του φορέα έκφρασης της LMP1 προκαλεί σημαντική πτώση στην ενεργότητα του υποκινητή κατά 3 φορές (1000% σε σχέση με την 3000% ενεργότητα παρουσία μόνο των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4). Ποσότητα 5 ng ή 10 ng του φορέα έκφρασης της LMP1 προκαλεί την ίδια σχεδόν πτώση στην ενεργότητα που έχει ο υποκινητής, από τις Smad3 και Smad4, κατά 12 φορές (250% σε σχέση με την 3000% ενεργότητα παρουσία μόνο των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4). Αυτό σημαίνει ότι η υπερέκφραση της LMP1 οδηγεί σε ένα πλατώ μεταγραφικής καταστολής του μονοπατιού του TGF- $\beta$ . Προφανώς, ποσότητα 2 ng του φορέα έκφρασης της LMP1 αρκεί για να αναστείλει κατά 65% την μεταγραφική ενεργοποίηση από την πρωτεΐνη Smad3 παρουσία της Smad4. Αντίστοιχη επιμόλυνση κυττάρων COS-7, με τις προαναφερθείσες ποσότητες του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1 $\Delta$ C, έδειξε ότι, ποσότητες 1 ng και 2 ng του φορέα έκφρασης της LMP1 $\Delta$ C προκαλούν ελάχιστη αύξηση στην ενεργότητα του υποκινητή (3100% και 3200% αντίστοιχα σε σχέση με την 3000% ενεργότητα παρουσία μόνο των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4). Ποσότητα 5 ng φορέα έκφρασης της LMP1 $\Delta$ C προκαλεί μικρή αύξηση στην ενεργότητα του υποκινητή (3500% σε σχέση με την 3000% ενεργότητα παρουσία μόνο των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4). Τέλος, ποσότητα 10 ng του φορέα έκφρασης της LMP1 $\Delta$ C προκαλεί πτώση στην ενεργότητα του υποκινητή κατά 1.25 φορές (2400% σε σχέση με την 3000% ενεργότητα παρουσία μόνο των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4). Η πρωτεΐνη LMP1 $\Delta$ C θεωρείται ανενεργή, συνεπώς, δεν αναμενόταν να προκαλεί πτώση στην μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή που χρησιμοποιήθηκε. Επομένως, η ποσότητα των 2 ng θεωρείται επαρκής για την μελέτη της δράσης των μεταλλαγμένων μορφών της

LMP1 στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β, χωρίς τον κίνδυνο, τα αποτελέσματα που θα προκύψουν να οφείλονται στην υπερέκφρασή τους.

Για την μελέτη αυτής της δράσης, κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον συνθετικό υποκινητή p12xCAGAluc, και τους φορείς έκφρασης των ανθρώπινων πρωτεϊνών Smad3 και Smad4, οι οποίες τον ενεργοποίησαν κατά 36 φορές, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 10**. Η συνεπιμόλυνση των κυττάρων αυτών με 2 ng του φορέα έκφρασης της LMP1 πρωτεΐνης, προκάλεσε πτώση της δραστηριότητας του υποκινητή κατά 4.5 φορές (600% σε σύγκριση με 3600% ενεργοποίηση που επιφέρουν οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4). Η επιμόλυνση των κυττάρων με την ίδια ποσότητα, του φορέα έκφρασης της LMP1ΔC ή της LMP1AAA προκάλεσε πτώση της μεταγραφικής ενεργότητας από τον συνθετικό υποκινητή κατά 1.3 και 2.4 φορές αντίστοιχα (2800% και 1500% αντίστοιχα, σε σύγκριση με 3600% ενεργοποίηση που επιφέρουν οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4). Επιμόλυνση των κυττάρων με την ίδια ποσότητα, του φορέα έκφρασης της LMP1Y384G ή της LMP1(1-231) προκάλεσε πολύ μεγάλη πτώση της μεταγραφικής ενεργότητας από τον συνθετικό υποκινητή κατά 4.5 και 4 φορές αντίστοιχα (800% και 900% αντίστοιχα, σε σύγκριση με 3600% ενεργοποίηση που επιφέρουν οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4). Τέλος, επιμόλυνση των κυττάρων με την ίδια ποσότητα, του φορέα έκφρασης της LMP1Δ188-351 ή της LMP1D1 προκάλεσε μικρή πτώση της μεταγραφικής ενεργότητας από τον συνθετικό υποκινητή κατά 1.2 και 1 φορές αντίστοιχα (3000% και 3400% αντίστοιχα, σε σύγκριση με 3600% ενεργοποίηση που επιφέρουν οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4). Το συμπέρασμα που προκύπτει από την **Εικόνα 10** είναι ότι οι μεταλλαγμένες μορφές του LMP1: LMP1ΔC, LMP1Δ188-351, και LMP1D1 είναι πρωτεΐνες με ελάχιστη ή καθόλου ενεργότητα αναστολής της σηματοδότησης από τον TGF-β. Αντίθετα, οι μεταλλαγμένες μορφές του LMP1: LMP1Y384G, LMP1AAA και LMP1(1-231) φαίνεται να φέρουν μεταλλάξεις που δεν επηρεάζουν την ανασταλτική τους δράση στο μονοπάτι του TGF-β, η οποία μοιάζει σε ένταση με εκείνη της αγρίου τύπου LMP1 πρωτεΐνης.



**Εικόνα 9.** Πείραμα τιτλοδότησης της βέλτιστης συγκέντρωσης της LMP1 πρωτεΐνης. Προκειμένου να βρεθεί η ελάχιστη δυνατή συγκέντρωση LMP1 πρωτεΐνης που να προκαλεί μέτρια και όχι πλήρη απενεργοποίηση του TGF-β μονοπατιού, κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p12xCAGAluc (2 μg), και το πλασμίδιο συμπλήρωσης pUC19, παρουσία ή απουσία πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 (2 μg) και Smad4 (2 μg). Από τον πλασμιδικό φορέα έκφρασης της αγρίου τύπου πρωτεΐνης LMP1, pSG5LMP1wt χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες ποσότητες των 1ng, 2ng, 5ng και 10ng, όπως υποδεικνύεται στο παραπάνω γράφημα. Άλλα δείγματα επιμολύνθηκαν με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του πλασμιδίου pSG5LMP1ΔC, ο οποίος εκφράζει μεταλλαγμένη LMP1 πρωτεΐνη από την οποία λείπει η C-τερματική περιοχή. Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



**Εικόνα 10.** Επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης LMP1 στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p12xCAGAluc (2 μg) και το πλασμίδιο συμπλήρωσης pUC19, παρουσία ή απουσία πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 (2 μg) και Smad4 (2 μg). Από τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pSG5LMP1wt, pSG5LMP1ΔC, pSG5LMP1AAA, pSG5LMP1Y384G, pcDNA3LMP1(1-231), pcDNALMP1Δ188-351, pSG5LMP1DI χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 2 ng, που από το πείραμα τιτλοδότησης, βρέθηκε ότι αναστέλλει επαρκώς το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Προκειμένου να εξεταστεί εάν οι επιπτώσεις της πρωτεΐνης LMP1 και των μεταλλαγμένων μορφών της στην ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή 12XCAGAluc, οφείλονται σε μείωση της έκφρασης ή αποικοδόμηση των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4, αναλύθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των τελευταίων. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς 12XCAGAluc, και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11**. Τα παραπάνω κύτταρα συνεπιμολύνθηκαν, επίσης, και με έναν, κάθε φορά, από τους φορείς έκφρασης των LMP1, LMP1AAA, LMP1ΔC, LMP1Y384G. Εναλλακτικά χρησιμοποιήθηκε και ένας άλλος φορέας έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1, ο pcDNA3LMP1. (Η μισή ποσότητα των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση της ενεργότητας του ενζύμου της λουσιφεράσης, σε πείραμα που δεν περιγράφεται στην παρούσα διατριβή). Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στην **Εικόνα 11**, από την οποία προκύπτει ότι η έκφραση των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4 παραμένει ίδια παρουσία της LMP1 πρωτεΐνης ή των μεταλλαγμένων μορφών της. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 11** δείχνουν ότι η επίδραση των LMP1 πρωτεϊνών στην μεταγραφική ενεργότητα των Smad3 Smad4, δεν αποδίδεται σε μείωση της έκφρασης των τελευταίων ή σε αποικοδόμηση τους.

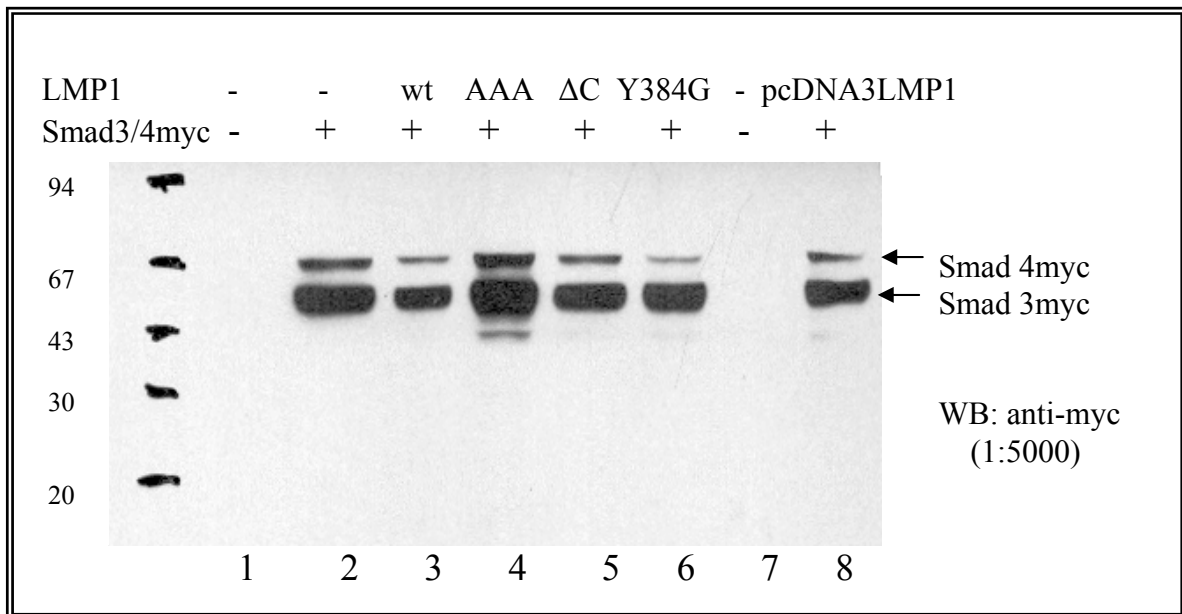
Ακολούθως, εξετάστηκε η δράση των μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης LMP1 στο μονοπάτι σηματοδότησης που χρησιμοποιεί η LMP1 και ενεργοποιεί τον παράγοντα NF-κΒ. Η μελέτη αυτή έγινε σε σύγκριση με τη δράση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης LMP1, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της Εικόνας 10, όσων αφορά στην δραστικότητα των μεταλλαγμένων μορφών. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης του 3xKBL που περιγράφηκε προηγουμένως και τον φορέα της αγρίου τύπου, ή των μεταλλαγμένων μορφών της LMP1. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 12**, η συνεπιμόλυνση των κυττάρων με τον πλασμιακό φορέα pSG5LMP1, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστικότητας του συνθετικού υποκινητή 3xKBL κατά 11 φορές. Η επιμόλυνση με τον φορέα έκφρασης της LMP1AAA προκάλεσε αύξηση της δραστικότητας του υποκινητή κατά 16 φορές, γεγονός που υποδεικνύει ότι η LMP1AAA είναι το ίδιο ενεργή, αν όχι περισσότερο, με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη LMP1. Η επιμόλυνση με τον φορέα έκφρασης της LMP1ΔC προκάλεσε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας από τον υποκινητή κατά 5 φορές, γεγονός που φαίνεται να της προσδίδει λιγότερη από την μισή ενεργότητα της αγρίου τύπου πρωτεΐνης LMP1. Η επιμόλυνση των κυττάρων με τον φορέα έκφρασης της LMP1Y384G ή της LMP1(1-231)



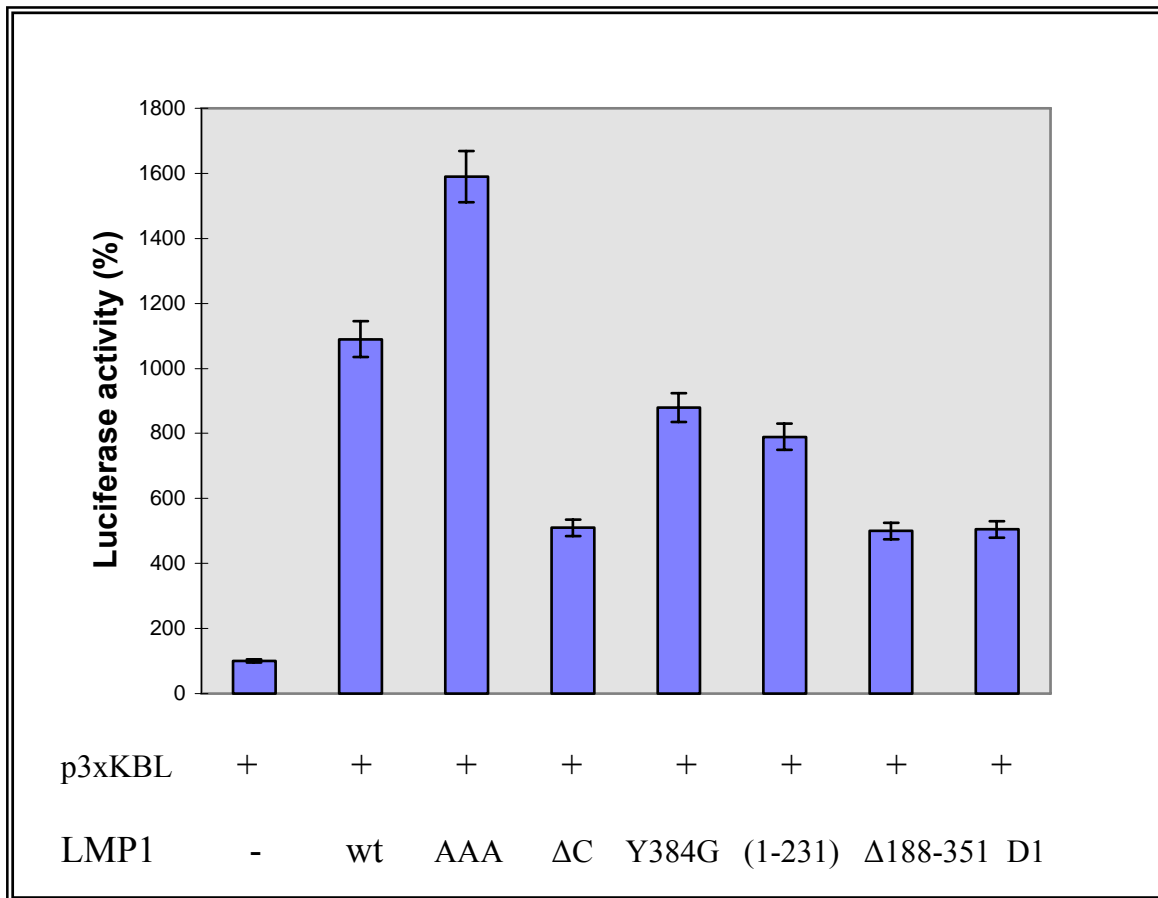
προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητας του υποκινητή κατά 9 και 8 φορές αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει, ότι αφ' ενός η σημειακή μετάλλαξη που φέρει η LMP1Y384G δεν επιφέρει δραματική μείωση στην ενεργότητά της, αφ' ετέρου ότι η περιοχή 1-231 που περιλαμβάνει την αμινοτερματική, τις έξι διαμεμβρανικές και την CTAR1 περιοχές προσδίδει αρκετή ενεργότητα επαγωγής του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στην μεταλλαγμένη αυτή πρωτεΐνη. Η επιμόλυνση των κυττάρων με τον φορέα έκφρασης της LMP1Δ188-351 ή της LMP1D1 προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητας του συνθετικού υποκινητή κατά 5 φορές. Αυτό υποδηλώνει, αφ' ενός ότι η παρουσία της αμινοτερματικής περιοχής, των έξι διαμεμβρανικών περιοχών και της CTAR2 περιοχής προσδίδει λιγότερη από την μισή ενεργότητα στην μεταλλαγμένη LMP1Δ188-351, σε σχέση με εκείνη της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, στα κύτταρα COS-7, και αφ' ετέρου ότι η έλλειψη των 4 πρώτων διμεμβρανικών περιοχών μειώνει κατά περισσότερο από 50% την ενεργοποίηση του NF-κB που επιφέρει η αγρίου τύπου LMP1 πρωτεΐνη.

Συνοπτικά, στα κύτταρα COS-7, οι περισσότερο ενεργές, για την επαγωγή του μονοπατιού του NF-κB, μεταλλαγμένες μορφές είναι οι: LMP1AAA, LMP1Y384G και LMP1(1-231), ενώ λιγότερο ενεργές φαίνεται να είναι οι: LMP1ΔC, LMP1Δ188-351 και LMP1D1. Τα παραπάνω συμφωνούν με τα αποτελέσματα της εικόνας 10, όπου οι περισσότερο ενεργές, για την καταστολή του μονοπατιού του TGF-β, μεταλλαγμένες μορφές είναι οι: LMP1AAA, LMP1Y384G και LMP1(1-231), ενώ λιγότερο ενεργές φαίνεται να είναι και πάλι οι: LMP1ΔC, LMP1Δ188-351 και LMP1D1.

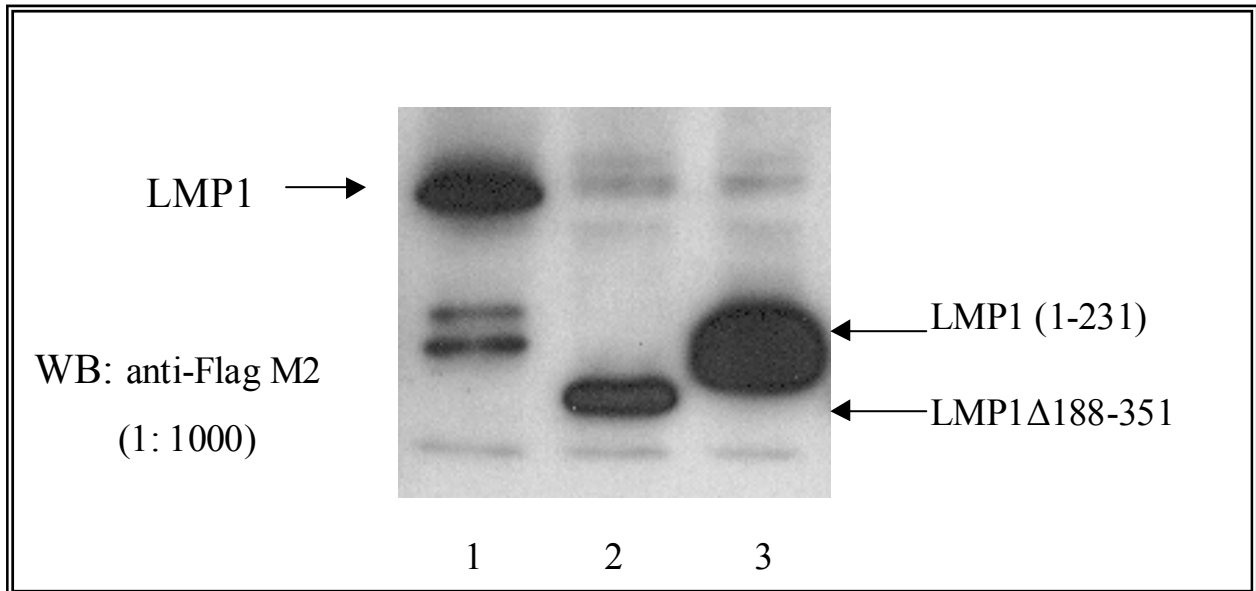
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η έκφραση τόσο της LMP1 πρωτεΐνης, όσο και των μεταλλαγμένων της μορφών, κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pSG5LMP1FLAG, τον pcDNA3LMP1FLAG(1-231), ή τον pcDNALMP1FLAGΔ188-351 και κυτταρικά εκχυλίσματα από τα επιμολυσμένα κύτταρα, υπεβλήθησαν σε ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας anti-Flag αντίσωμα, καθώς οι αντίστοιχες πρωτεΐνες είναι σημασμένες με τον επίτοπο Flag. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 13**, οι πρωτεΐνες LMP1, LMP1(1-231) και LMP1Δ188-351, εκφράζονται σε ικανοποιητικά επίπεδα.



**Εικόνα 11.** Η έκφραση της πρωτεΐνης LMP1 ή των μεταλλαγμένων μορφών της δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4. Κύτταρα COS-7 συνεπιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p12xCAGAluc (2 μg), και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3myc και Smad4myc, pcDNAIampSmad3myc (2 μg) και pcDNAIampSmad4myc(2 g) αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης 2 μg των φορέων έκφρασης pSG5LMP1, pSG5LMP1AAA, pSG%ΔC, pSG5LMP1Y384G και του pcDNA3LMP1 που είναι ένας άλλος φορέας έκφρασης της LMP1 πρωτεΐνης. Η ανανέωση του θρεπτικού πραγματοποιήθηκε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση, και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες. Μετά την επαναδιάλυση των κυττάρων σε κατάλληλο όγκο διαλύματος PBS, τα δείγματα μοιράστηκαν ισόποσα, ώστε να πραγματοποιηθούν πειράματα ανάλυσης της δραστηριότητας της λουσιφεράσης και της πρωτεϊνικής έκφρασης. Για την ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε βρασμό με διάλυμα 2x SDS και ίσες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ηλεκτροφορήθηκαν (SDS/PAGE). Ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου ανιχνεύθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών Smad3myc και Smad4myc. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ποντικού έναντι του επίτοπου myc των πρωτεϊνών, anti-myc 1:5000 ενώ ως δευτερεύον αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε goat anti-mouse HRP. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού ECL και αυτοραδιογραφία. Οι γραμμές (lanes) 1 και 7 αποτελούν τον αρνητικό έλεγχο του πειράματος (επιμόλυνση των δειγμάτων μόνο με το πλασμίδιο αναφοράς).



**Εικόνα 12.** Επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης LMP1 στο σηματοδοτικό μονοπάτι του παράγοντα NF-κB. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p3xKBL (2 μg) και το πλασμίδιο συμπλήρωσης pBS (pBluescript K+). Χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμδιακούς φορείς έκφρασης pSG5LMP1 FLAG wt, pSG5LMP1ΔC, pSG5LMP1AAA, pSG5LMP1Y384G, pcDNA3LMP1 FLAG (1-231), pcDNALMP1 FLAG Δ188-351, pSG5LMP1DI σε ποσότητα 2 ng από το κάθε ένα, η οποία, από το πείραμα τιτλοδότησης, βρέθηκε ότι αναστέλλει επαρκώς το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



**Εικόνα 13.** Ανίχνευση της πρωτεϊνικής έκφρασης της LMP1 και δύο μεταλλαγμένων μορφών της. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pSG5LMP1 FLAG wt (5 µg), ή pcDNA3LMP1 FLAG (1-231) (10 µg), ή pcDNA3LMP1 FLAG Δ188-351 (5 µg), και το πλασμίδιο συμπλήρωσης pBS (Bluescript K+) (5 µg). Η αλλαγή του θρεπτικού έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Μετά τις εκπλύσεις με διάλυμα PBS, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση ίσης ποσότητας από κάθε δείγμα πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε 12% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS/PAGE), και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western blotting). Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα mouse anti-Flag M2 που ανιχνεύει τον N-τερματικό επίτοπο των πρωτεϊνών (1: 1000), anti-mouse HRP (1:10000), το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού ECL, και αυτοραδιογραφία.

## **Αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β από τους μεταγωγείς της ενεργοποίησης του NF-κΒ που χρησιμοποιεί η LMP1 πρωτεΐνη.**

Όπως αναφέρθηκε, η πρωτεΐνη LMP1 φαίνεται να χρησιμοποιεί το μονοπάτι ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ για να αναστείλλει τη μετάδοση του σήματος του TGF-β. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρατήρηση αυτή, εξετάστηκε η δράση μεταγωγέων του σήματος που οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κΒ, τόσο στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β, όσο και στο μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κΒ παρουσία της πρωτεΐνης LMP1.

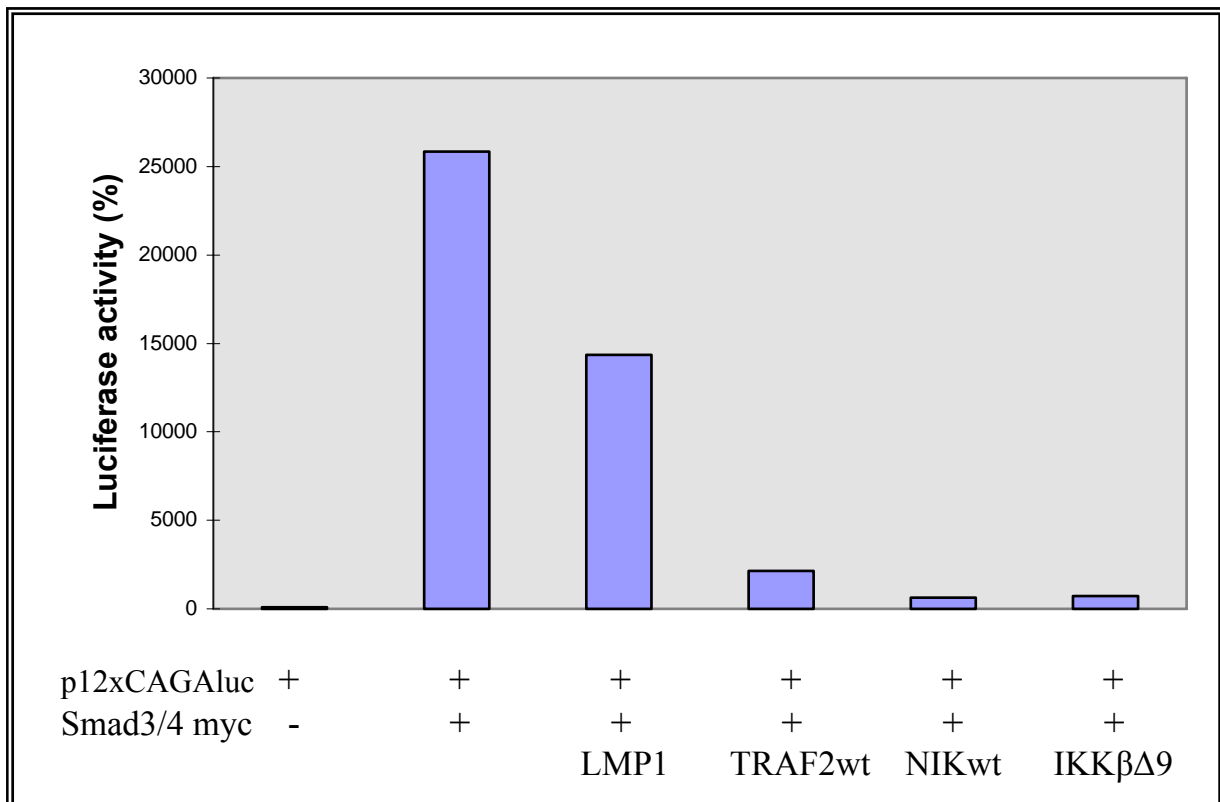
Όπως υποδεικνύει η **Εικόνα 14**, κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς 12xCAGAluc και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4. Η επιμόλυνση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας από τον συνθετικό υποκινητή 12xCAGAluc κατά 26 φορές. Η συνεπιμόλυνση των κυττάρων αυτών με 2 ng του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1 είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της ενεργοποίησης του υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4 κατά 1.9 φορές (14000% σε σύγκριση με την 26000% ενεργοποίηση απουσία της LMP1). Η επιμόλυνση των κύτταρων με 10 μg του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης TRAF2, προκάλεσε δραματική πτώση της ενεργοποίησης του υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4, κατά 13 φορές (2000% σε σύγκριση με την 26000% ενεργοποίηση απουσία της TRAF2). Τέλος, η επιμόλυνση των κύτταρων με 10 μg του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης NIK, ή της IKKβΔ9 προκάλεσε ακόμα μεγαλύτερη πτώση της μεταγραφικής ενεργότητας του 12xCAGAluc από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4, κατά 29 και 26 φορές αντίστοιχα (900% και 1000% αντίστοιχα, σε σύγκριση με την 26000% ενεργοποίηση απουσία της NIK ή της IKKβΔ9 αντίστοιχα). Η IKKβΔ9 είναι μια μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης IKKβ που διατηρεί, όμως, την δραστηριότητα της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, όπως έδειξαν πειράματα σε λεμφοκύτταρα. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 14** υποδηλώνουν ότι η υπερέκφραση κάθε ενός από τους μεταγωγείς του σήματος ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κΒ, TRAF2, NIK και IKKβΔ9, αναστέλλει σε σημαντικό βαθμό το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β, το οποίο επάγεται με την έκφραση των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4.

Προκειμένου να βεβαιωθούμε ότι η παραπάνω παρατήρηση δεν οφείλεται στην αποικοδόμηση ή στη μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4 από τις LMP1, ή TRAF2, ή NIK, ή IKKβΔ9, η μισή ποσότητα πρωτεϊνικού

εκχυλίσματος, από κάθε επιμόλυνση του προηγούμενου πειράματος, χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των Smad3 και Smad4. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15** η υπερέκφραση των IKKβΔ9, ή NIK, ή TRAF2, ή η έκφραση της LMP1, δεν επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4. Συνεπώς τα αποτελέσματα της εικόνας 14 αντικατοπτρίζουν τη δράση των προαναφερθέντων μεταγωγέων σήματος και της LMP1, στη μεταγραφική δραστηριότητα των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών.

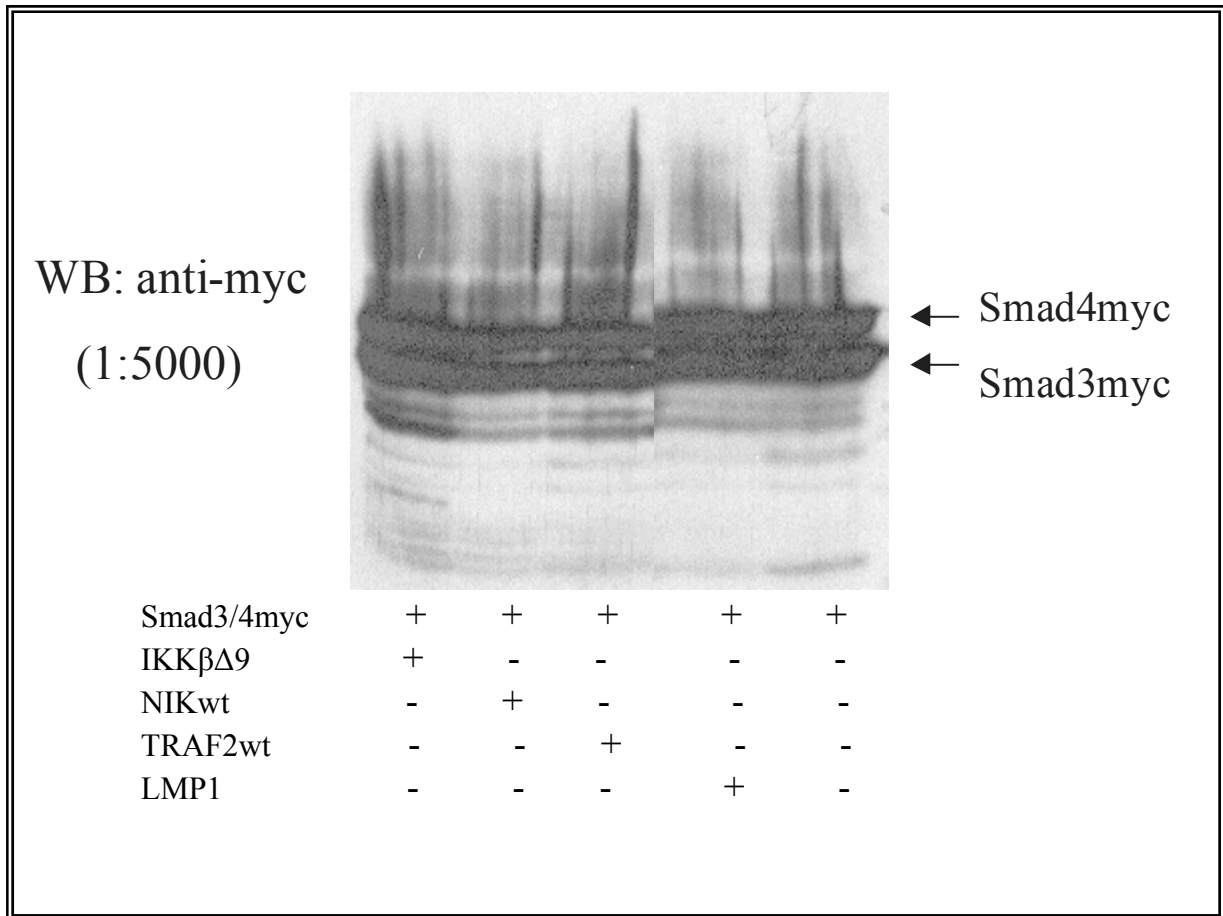
Για να επιβεβαιώσουμε ότι τα παραπάνω αποτελέσματα, δεν οφείλονται στην υπερέκφραση των μεταγωγέων σήματος, αλλά και για να εξετάσουμε τη δράση τους στο σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κΒ που χρησιμοποιείται από την πρωτεΐνη LMP1, επαναλάβουμε το πείραμα της Εικόνας 14, αλλά αυτή τη φορά χρησιμοποιήσαμε μικρότερη συγκέντρωση πλασμιδίων που εκφράζουν τους μεταγωγείς (2μg αντί για 10 μg της Εικόνας 14). Συγκεκριμένα, όπως περιγράφεται στην **Εικόνα 16Α**, κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς 12xCAGAluc και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4. Η επιμόλυνση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του συνθετικού υποκινητή 12xCAGAluc κατά 15 φορές. Η συνεπιμόλυνση των κυττάρων αυτών με 2 μg του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1 είχε ως αποτέλεσμα τη δραματική πτώση της ενεργοποίησης του υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4, κατά 12.5 φορές (1200% σε σύγκριση με την 15000% ενεργοποίηση απουσία της LMP1). Το γεγονός αυτό αναμενόταν, καθώς χρησιμοποιήθηκε υψηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης LMP1. Η επιμόλυνση των κυττάρων με 2 μg του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης TRAF2, αντί της LMP1, προκάλεσε μείωση της ενεργοποίησης του υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4 κατά 1.8 φορές (8500% σε σύγκριση με την 15000% ενεργοποίηση απουσία της TRAF2). Τέλος, η επιμόλυνση των κυττάρων με 2 μg του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης IKKβΔ9 προκάλεσε ακόμα μεγαλύτερη πτώση της μεταγραφικής ενεργότητας του 12xCAGAluc από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4, κατά 7.5 φορές (2000% σε σύγκριση με την 15000% ενεργοποίηση απουσία της IKKβΔ9). Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 16Α** δείχνουν ότι η έκφραση, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, της TRAF2 και πολύ περισσότερο της IKKβΔ9, αναστέλλουν το μονοπάτι του TGF-β που επάγεται από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4.

Ακολούθως, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 16B**, κύτταρα COS-7 συνεπιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p3xKBL και 2 μg του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1. Το αποτέλεσμα ήταν η δραματική αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του συνθετικού υποκινητή κατά 12.5 φορές. Η συνεπιμόλυνση των κυττάρων αυτών με 2 μg του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης TRAF2 προκάλεσε αύξηση της ενεργοποίησης του p3xKBL κατά 6.5 φορές. Επίσης, η συνεπιμόλυνση των κυττάρων με 2 μg του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης IKKβΔ9 προκάλεσε μικρότερη αύξηση της ενεργοποίησης του p3xKBL κατά 5.5 φορές. Συμπεραίνουμε, επομένως, ότι η έκφραση της πρωτεΐνης TRAF2 και λιγότερο της πρωτεΐνης IKKβΔ9, παρουσία της LMP1, επάγει το μονοπάτι σηματοδότησης που οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.

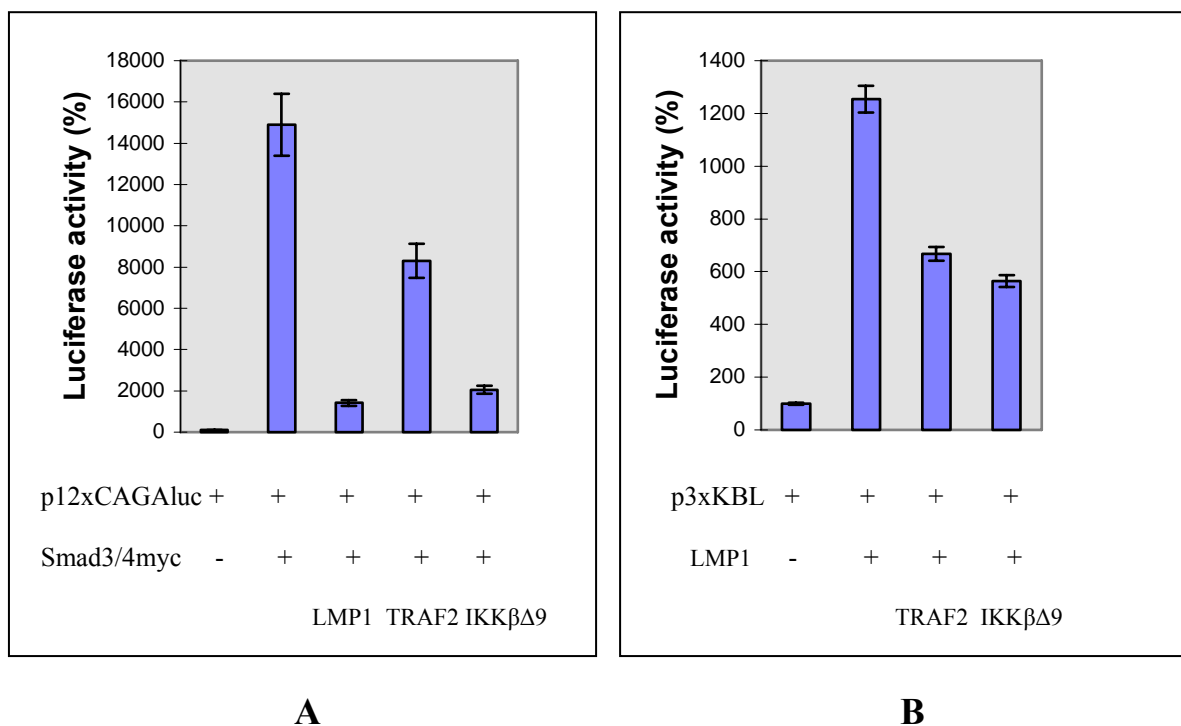


**Εικόνα 14.** Ανταγωνιστική δράση των μεταγωγέων του NF-κB στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p12xCAGA (3 μg) και το πλασμίδιο συμπλήρωσης pBS (pBluescript K+). Χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pcDNAIampSmad3myc (2 μg), pcDNAIampSmad4myc (2 μg), pSG5LMP1wt (2 ng), καθώς και pcDNA3FLAG TRAFwt, pcDNA3FLAG NIKwt και pcDNA3FLAG IKKβΔ9 (σε ποσότητα 10 μg από το κάθε ένα). Η επιμόλυνση έγινε σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία p60. Η αλλαγή του θρεπτικού έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ακόμα ώρες. Μετά τις εκπλύσεις και την αποκόλληση των κυττάρων, τα δείγματα μοιράστηκαν σε δύο ισόποσα μέρη για την μελέτη τόσο της ενεργότητας του ενζύμου της λουσιφεράσης, όσο και για την ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης των Smad3myc και Smad4myc. Η % δραστικότητα του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος στο παραπάνω γράφημα. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.





**Εικόνα 15.** Η μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας των πρωτεϊνών Smad3/4myc, παρουσία των επαγωγέων του μονοπατιού του NF-κB, δεν οφείλεται σε μείωση του επιπέδου έκφρασής τους. Πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση κυττάρων COS-7, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 9. Για την ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η μισή ποσότητα των επιμολυσμένων κυττάρων. Τα δείγματα, μετά από βρασμό, υποβλήθηκαν σε SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση. Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ακολούθησε η διαδικασία ανίχνευσης της έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3/4myc, με χρησιμοποίηση αντισώματος έναντι του myc επίτοπου (anti-myc, 1: 5000), anti mouse HRP, ECL συστήματος ανοσοαποτύπωσης και αυτοραδιογραφία.



**Εικόνα 16.** Επίδραση των μεταγωγέων του μονοπατιού NF-κB στα μονοπάτια σηματοδότησης των LMP1 και TGF-β. **A.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p12xCAGA (2 μg) και το πλασμίδιο συμπλήρωσης pUC19. Χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pcDNAIampSmad3myc (2 μg), pcDNAIampSmad4myc (2 μg), pSG5LMP1wt (2 μg), καθώς και pcDNA3FLAG TRAF2wt, pcDNA3FLAG NIKwt και pcDNA3FLAG IKKβΔ9 (σε ποσότητα 2 μg από το κάθε ένα). **B.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p3xKBL (2 μg) και το πλασμίδιο συμπλήρωσης pUC19. Χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pSG5LMP1wt (2 μg), καθώς και pcDNA3FLAG TRAF2wt, pcDNA3FLAG NIKwt και pcDNA3FLAG IKKβΔ9 (σε ποσότητα 2 μg από το κάθε ένα). Σε στις δύο περιπτώσεις, η αλλαγή του θρεπτικού έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ακόμα ώρες. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος στο παραπάνω γράφημα. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pGKβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

## **Ο παράγοντας NF-κB αναστέλλει το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β.**

Το γεγονός ότι το μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB χρησιμοποιείται από την πρωτεΐνη LMP1 για να αναστείλει την μετάδοση σήματος από τον μετασχηματίζοντα αυξητικό παράγοντα TGF-β, μας ώθησε να εξετάσουμε την επίδραση του ίδιου του NF-κB, και μεταλλαγμένων μορφών του, τόσο στη σηματοδότηση από τον TGF-β, όσο και στην δραστηριότητά του στον υποκινητή 3xKBL. Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης p65, της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p65ΔC, η οποία στερείται ολόκληρης της καρβοξυτελικής περιοχής της αγρίου τύπου p65, της πρωτεΐνης p50, που αποτελεί μια άλλη πολυπεπτιδική υπομονάδα του NF-κB που σχηματίζει έτερο- και ομο-διμερή σύμπλοκα, ή της υβριδικής πρωτεΐνης p50/65, που αποτελείται από την περιοχή πρόσδεσης στο DNA της p50 και την περιοχή ενεργοποίησης της p65 πρωτεΐνης.

Για την ανάλυση της επίδρασης των προαναφερθέντων πρωτεϊνών στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β, κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς του 12xCAGAluc, παρουσία του TGF-β (400 pM) για 24 ώρες. Καθώς τα κύτταρα αυτά έχουν αυξημένο αριθμό υποδοχέων του TGF-β, η προαναφερθήσα επιμόλυνση είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργοποίησης του συνθετικού υποκινητή κατά 650 φορές, όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 17**. Η συνεπιμόλυνση των κυττάρων αυτών με τον φορέα έκφρασης της p65 προκάλεσε δραματική πτώση της ενεργοποίησης του υποκινητή από τον TGF-β, κατά 8 φορές (8000% σε σύγκριση με την 65000% ενεργοποίηση από τον TGF-β). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη p65 δρα ως αναστολέας του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β στα κύτταρα HepG2. Αντίθετα, η επιμόλυνση των κυττάρων με τον φορέα έκφρασης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p65ΔC, ή της πρωτεΐνης p50 προκάλεσε πτώση της ενεργοποίησης του υποκινητή από τον TGF-β, κατά 1.3 και 1.2 φορές αντίστοιχα (51000% και 55000% αντίστοιχα σε σύγκριση με την 65000% ενεργοποίηση από τον TGF-β). Αυτό σημαίνει, αφ' ενός ότι η καρβοξυτελική περιοχή της p65 είναι σημαντική για τη δράση της ως αναστολέα του μονοπατιού του TGF-β στα κύτταρα HepG2, αφ' ετέρου ότι η υπομονάδα p50 δρα λιγότερο ανασταλτικά, για την σηματοδότηση του TGF-β, σύμπλοκα, από ότι η p65. Η επιμόλυνση των κυττάρων με τον φορέα έκφρασης της υβριδικής πρωτεΐνης p50/65 οδήγησε σε αρκετά μεγάλη πτώση της ενεργοποίησης του υποκινητή 3xKBL από τον TGF-β, κατά 2.7 φορές (24000% σε σύγκριση με την 65000% ενεργοποίηση από τον TGF-β).

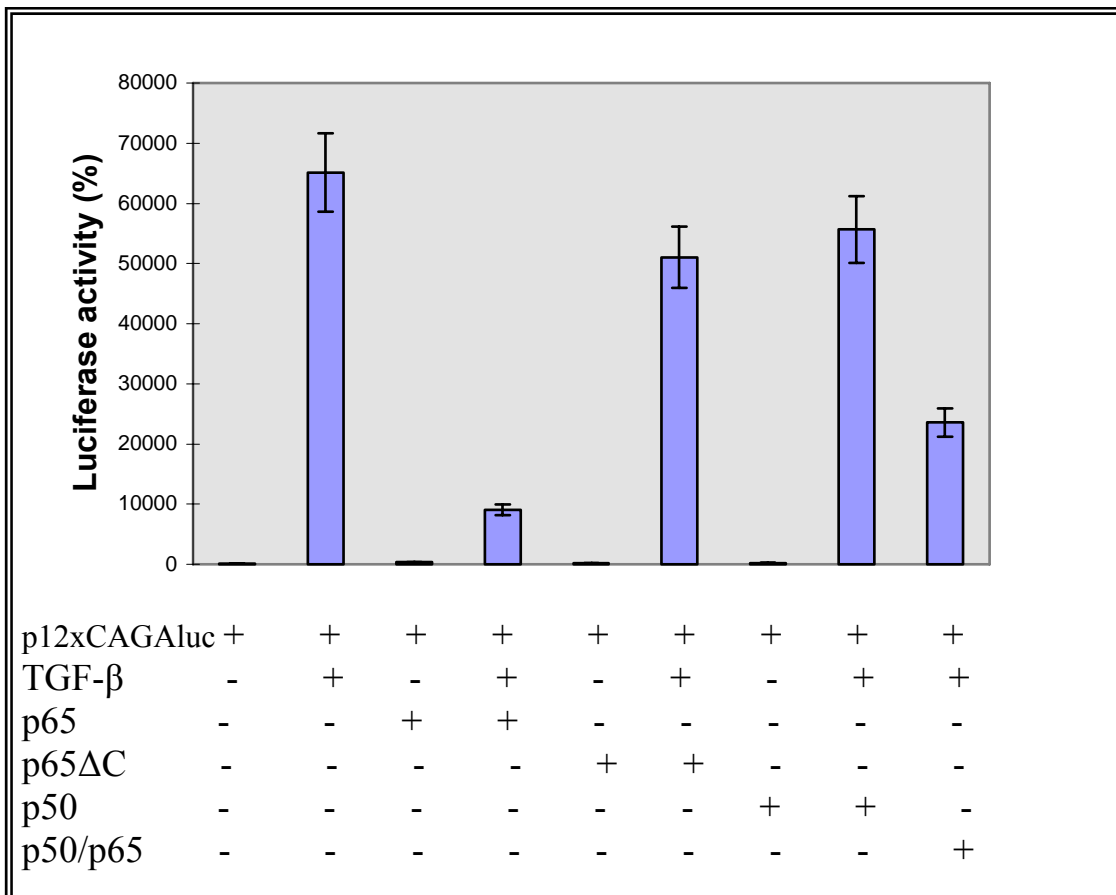
Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα προηγούμενα, που υποδεικνύουν την περιοχή μεταγραφικής ενεργότητας της p65 ως σημαντική για την δράση της ως αναστολέα του μονοπατιού του TGF-β. Τέλος, η συνεπιμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο αναφοράς 12xCAGAluc, και τον φορέα έκφρασης της p65, ή της p65ΔC, ή της p50, απουσία του TGF-β, δεν ενεργοποίησε σε καμμία περίπτωση την μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή 12xCAGAluc. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες αυτές δεν έχουν καμμία επίδραση στον υποκινητή 12xCAGAluc.

Για να επιβεβαιωθούν οι προηγούμενες παρατηρήσεις, κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς του συνθετικού υποκινητή 12xCAGAluc και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18Α**. Η συνεπιμόλυνση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του 12xCAGAluc κατά 100 φορές. Συνεπιμόλυνση των κυττάρων αυτών με τον φορέα έκφρασης της υβριδικής πρωτεΐνης p50/65 προκάλεσε δραματική πτώση της ενεργοποίησης του συνθετικού υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4, κατά 85 φορές (120% σε σύγκριση με την 10000% ενεργοποίηση που επιφέρουν οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η παρουσία της περιοχής με την μεταγραφική ενεργότητα της πρωτεΐνης p65, αρκεί για να αναστείλλει την ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4. Η επιμόλυνση των κυττάρων με τον φορέα έκφρασης της αγρίου τύπου πρωτεΐνης p65, ανέστειλε πλήρως την ενεργοποίηση του 12xCAGAluc από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4. Συνοπτικά, τα αποτελέσματα των Εικόνων 17 και 16Α δείχνουν ότι η αγρίου τύπου πρωτεΐνη p65 που περιέχει ακέραια την καρβοξυτελική περιοχή με την μεταγραφική ενεργότητα, αναστέλλει πλήρως το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β που επάγεται είτε με την προσθήκη εξωγενούς TGF-β, είτε με την έκφραση των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4, τόσο σε κύτταρα HepG2, όσο και σε κύτταρα COS-7. Οι πρωτεΐνες p50/65, p50 και p65ΔC είναι πρωτεΐνες προοδευτικά μειωμένης ανασταλτικής, για τον TGF-β, δράσης.

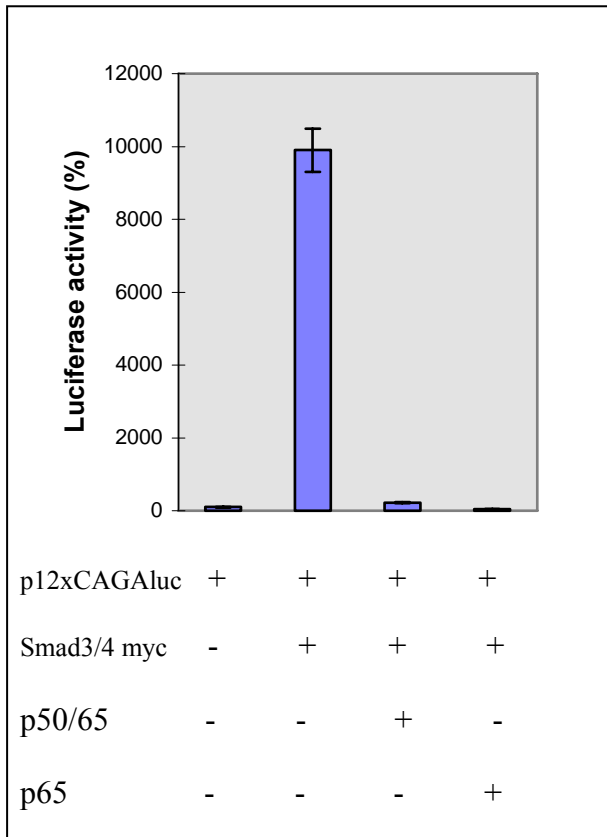
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή 3xKBL από τον NF-κB, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση που περιγράφεται στην **Εικόνα 18Β**. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς αυτού του υποκινητή και τον φορέα έκφρασης της υβριδικής πρωτεΐνης p50/65. Το αποτέλεσμα της συνεπιμόλυνσης αυτής, ήταν η αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποκινητή 3xKBL κατά 35 φορές. Η επιμόλυνση των κυττάρων με τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης p65, προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητας του υποκινητή

κατά 18 φορές. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 18B** δείχνουν ότι η υβριδική πρωτεΐνη p50/65, καθώς περιέχει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA της πρωτεΐνης p50, προσδένεται καλύτερα από την πρωτεΐνη p65 στις τρεις θέσεις πρόσδεσης που φέρει ο υποκινητής 3xKBL, και τον ενεργοποιεί μέσω της περιοχής ενεργότητας της p65.

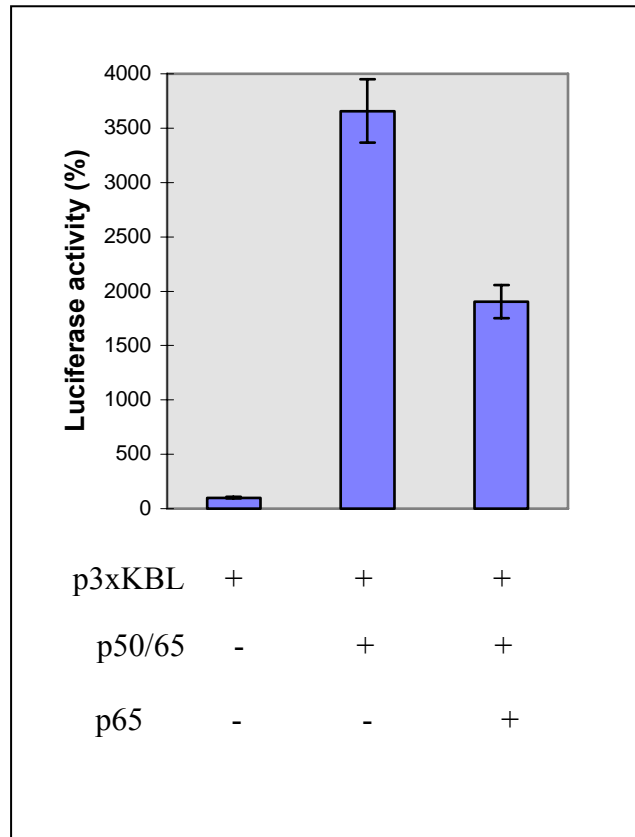
Για να επιβεβαιώσουμε ότι τα αποτελέσματα της Εικόνας 18A, σύμφωνα με τα οποία, οι πρωτεΐνες p50/65 και p65 αναστέλλουν το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β που επάγεται με την έκφραση των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4, είναι ακριβή, αναλύσαμε τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 19**, η έκφραση των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4 δεν επηρεάζεται από την συνέκφραση της p50/65 ή της p65 πρωτεΐνης. Συνεπώς, η πτώση της μεταγραφικής ενεργότητας των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4 που προκαλείται από την πρωτεΐνη p50/65 ή την p65, δεν οφείλεται στην μείωση της έκφρασης ή στην αποικοδόμηση των πρώτων.



**Εικόνα 17.** Επίδραση του παράγοντα NF-κB και μεταλλαγμένης του μορφής, στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς 12xCAGAluc (2 μg), και το πλασμίδιο συμπλήρωσης pBS, απουσία ή παρουσία του παράγοντα TGF-β (400 pM) και φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών p65 (2 μg), p65ΔC (2 μg), p50 (2 μg), και p50/p65 (2 μg), όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η p50/65 είναι υβριδική πρωτεΐνη που αποτελείται από την περιοχή πρόσδεσης στο DNA της υπομονάδας p50 και την περιοχή ενεργοποίησης της υπομονάδας p65. Η αλλαγή του θρεπτικού έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση για άλλες 24 ώρες. Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

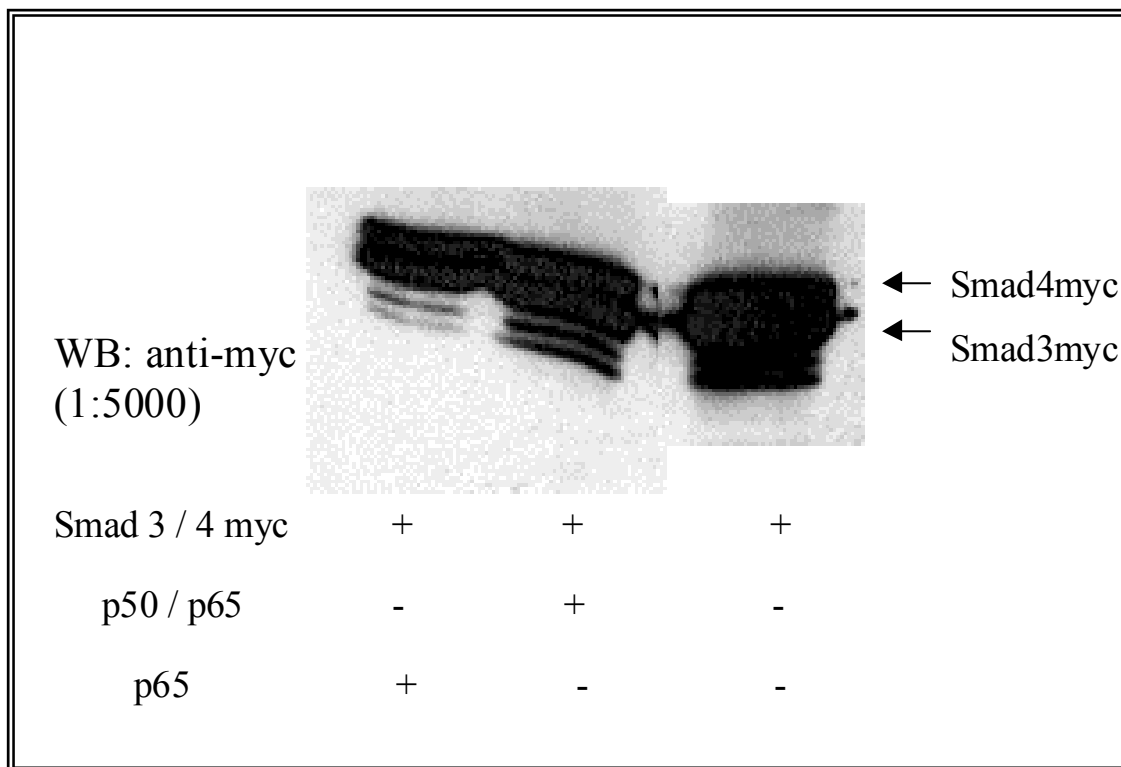


**A**



**B**

**Εικόνα 18.** Ανάλυση της ενεργότητας του NF-κB και μελέτη της δράσης του στη μεταγραφική ενεργοποίηση από τις πρωτεΐνες Smad3myc και Smad4myc. **A.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς 12xCAGAluc (2 μg) και το πλασμίδιο συμπλήρωσης pUC19. Χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3myc (2 μg), Smad4myc (2 μg), p65 (2 μg) και p50/p65 (2 μg), όπως δηλώνεται στο κάτω μέρος του γραφήματος A. **B.** Αντίστοιχη επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε, και πάλι σε COS-7 κύτταρα, με πλασμίδιο αναφοράς p3xKBLH (2 μg), και τους φορείς έκφρασης των p65 και p50/65, όπως υποδεικνύεται στο γράφημα B. Η p50/65 είναι υβριδική πρωτεΐνη που αποτελείται από την περιοχή πρόσδεσης στο DNA της υπομονάδας p50 και την περιοχή ενεργοποίησης της υπομονάδας p65. Η αλλαγή του θρεπτικού έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση για άλλες 24 ώρες. Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογραμμάτων. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



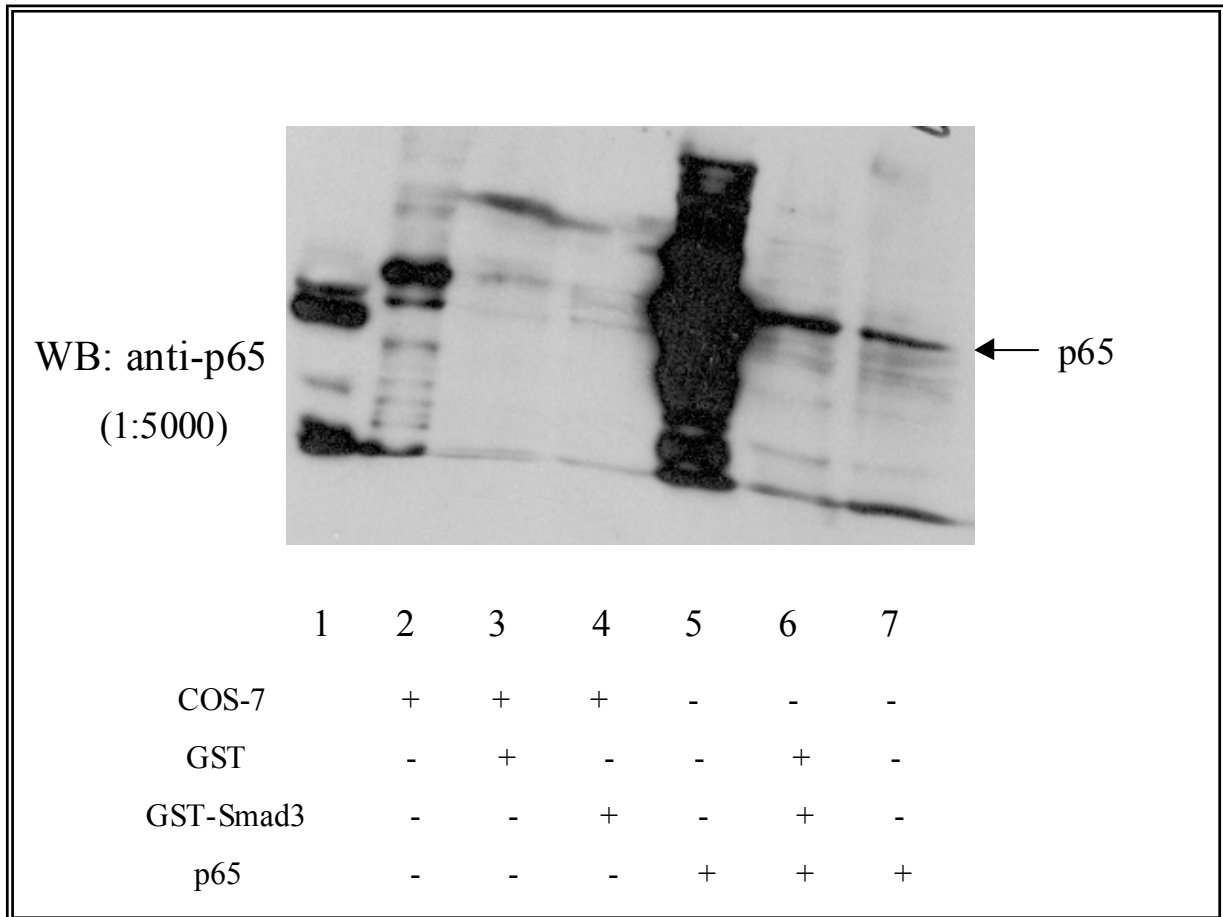
**Εικόνα 19.** Διατήρηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3myc και Smad4myc παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση COS-7 κύτταρων, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 13. Η μισή ποσότητα των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3myc και Smad4myc. Ίση ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κάθε δείγμα, ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12%, ύστερα από βρασμό. Ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Για την ανίχνευση των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ποντικού έναντι του επίτοπου myc των πρωτεϊνών, (anti-myc 1:5000), ενώ ως δευτερεύον αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε goat anti-mouse HRP. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού ECL και αυτοραδιογραφία.



## Μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Smad3 και p65 *in vitro* και *in vivo*.

Η δραματική αναστολή του μονοπατιού του TGF- $\beta$  από την πρωτεΐνη p65, μας ώθησε να μελετήσουμε αν υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης p65 και του κυριώτερου μεταγωγέα του μονοπατιού του TGF- $\beta$ , της Smad3. Στην **Εικόνα 20** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της *in vitro* ανάλυσης (pull down) για την διαπίστωση της προαναφερθείσας αλληλεπίδρασης. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης p65, ενώ χρησιμοποιήθηκε και πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα COS-7 που δεν επιμολύνθηκαν. Στα τελευταία ανιχνεύθηκε η ενδογενής πρωτεΐνη p65 (γραμμή 2 της Εικόνας 20). Παρατηρήθηκε ασθενής αλληλεπίδραση της p65 με σφαιρίδια GST, (γραμμή 3 της Εικόνας 20), ενώ δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση της p65 με σφαιρίδια GST-Smad3 (γραμμή 4 της Εικόνας 20). Στα κύτταρα COS-7 που επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης p65, ανιχνεύθηκε η υπερεκφρασμένη p65 πρωτεΐνη (γραμμή 5 της Εικόνας 20), η αλληλεπίδρασή της με τα σφαιρίδια GST (γραμμή 6 της Εικόνας 20), καθώς και η αλληλεπίδρασή της με σφαιρίδια GST-Smad3 (γραμμή 7 της Εικόνας 20). Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να οφείλεται στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης p65 με τα σφαιρίδια GST, και συνεπώς, από την *in vitro* αυτή ανάλυση, δεν προκύπτει σαφής εικόνα για την αλληλεπίδραση ή μη της p65 με την πρωτεΐνη Smad3.

Για το λόγο αυτό καταφύγαμε σε *in vivo* ανάλυση, προκειμένου να διαπιστώσουμε αν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης p65 και της Smad3 (Co-Immunoprecipitation). Έτσι, κύτταρα COS-7 συνεπιμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών p65, Smad3myc, Smad4myc και CA-ALK5. Ακολούθησε κατακρήμνιση με χρήση αντισώματος έναντι του επίτοπου myc και ανίχνευση της συνκατακρημνισθείσας πρωτεΐνης p65, όπως δείχνεται στο επάνω μέρος της **Εικόνας 21**. Στο κάτω μέρος της ίδιας εικόνας, επιβεβαιώνεται η έκφραση των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4. Η γραμμή 1 αντιστοιχεί σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα των επιμολυσμένων κυττάρων, οι 2 και 3 σε εκχυλίσματα στα οποία δεν έγινε κατακρήμνιση με anti-myc αντίσωμα και για αυτό δεν ανιχνεύονται οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες, αλλά ούτε η p65 αφού δεν κατακρημνίζεται το σύμπλοκό με το οποίο αλληλεπιδρά. Στις γραμμές 5 και 6 όπου κατακρημνίστηκαν οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4 με anti-myc, συνκατακρημνίζεται και η πρωτεΐνη p65. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ασθενή *in vivo* αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης p65 με την φωσφορυλιωμένη Smad3 που σχηματίζει σύμπλοκο με την Smad4.



**Εικόνα 20. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Smad3 και p65 *in vitro***

**(pull down).** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα

έκφρασης της πρωτεΐνης p65, pRCCMVp65 (20 µg), ενώ καλλιεργήθηκαν και

COS-7 κύτταρα που δεν επιμολύνθηκαν. Στην παραπάνω εικόνα τα μη

επιμολυσμένα κύτταρα αναφέρονται ως COS-7. 16 ώρες μετά την επιμόλυνση

έγινε αλλαγή στο θρεπτικό υλικό των επιμολυσμένων και μη κυττάρων, και

ακολούθησε επώαση 24 ακόμα ωρών. Για την αποκόλληση των κυττάρων

χρησιμοποιήθηκε διάλυμα WCE. Κρατήθηκαν δείγματα πρωτεϊνικών

εκχυλισμάτων και από τα επιμολυσμένα και από τα COS-7 κύτταρα, προς

ανάλυση της ηλεκτροφορητικής τους κινητικότητας. Κατόπιν, τα πρωτεϊνικά

εκχυλίσματα επιμολυσμένων και μη κυττάρων, επώαστηκαν στους 4<sup>0</sup>C για 1.5

ώρες με σφαιρίδια GST ή με σφαιρίδια GST-Smad3, παρουσία διαλύματος

αλληλεπίδρασης 2x Interaction Buffer. Μετά από εκπλύσεις με διάλυμα άλατος

100 mM KCl, πραγματοποιήθηκε SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε 12% πήκτωμα

πολυακρυλαμίδης, και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Για την ανίχνευση της συνκατακρήμισης της p65 πρωτεΐνης με τα σφαιρίδια

GST ή/και με τα σφαιρίδια GST-Smad3, χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό

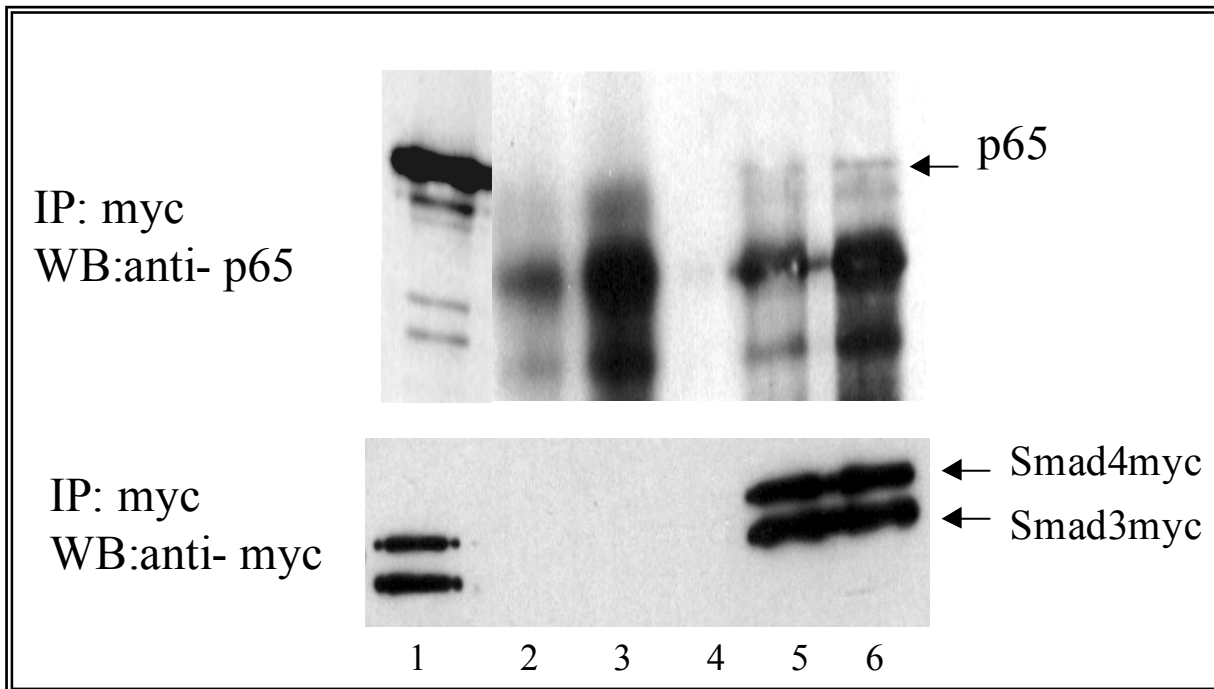
αντίσωμα rabbit anti-p65 (1:5000) και anti-rabbit HRP (1:10000), το σύστημα

ECL και αυτοραδιογραφία. Στην παραπάνω εικόνα ο αριθμός 1 αντιστοιχεί σε

πρωτεΐνη-δείκτη μοριακού βάρους (οι δύο ζώνες που φαίνονται αντιστοιχούν σε

60Kb και 14Kb), ενώ οι υπόλοιποι αριθμοί σε διάφορους συνδυασμούς

αλληλεπιδράσεων που υποδεικνύονται.



**Εικόνα 21.** Αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης p65 με το πρωτεϊνικό σύμπλοκο Smad3myc/ Smad4myc, *in vivo* (Co-IP). Προκειμένου να εξεταστεί αν η πρωτεΐνη p65 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Smad3, κύτταρα COS-7 συνεπιμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pRCCMVp65 (5 µg), pcDNA1ampSmad3myc (5 µg), pCDNAampISmad4myc (5 µg) και CA-ALK5 (5 µg). Η ανανέωση του θρεπτικού έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση, και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ακόμα ώρες. Μετά τις εκπλύσεις και την επώαση σε διάλυμα λύσης, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν και στο υπερκείμενο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προστέθηκαν σφαιρίδια σεφαρόζης της πρωτεΐνης A, προς καθαρισμό των δειγμάτων. Ακολούθησε επώαση στους 4<sup>0</sup> C για 30 min, και προσθήκη στο υπερκείμενο, 1 µl μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του επίτοπου myc των πρωτεϊνών Smad, anti-myc. Μετά από επώαση 2 ωρών στους 4<sup>0</sup> C στα δείγματα προστέθηκαν σφαιρίδια σεφαρόζης πρωτεΐνης G, στα οποία προσκολλάται το αντίσωμα και συνεπώς οι Smad3/4 και οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με αυτές. Ακολούθησαν εκπλύσεις με διάλυμα λύσης, βρασμός και ανάλυση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των πρωτεϊνών με SDS/PAGE. Μετά την μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η ανίχνευση της έκφρασης των Smad3myc και Smad4myc έγινε με anti-myc (1 :5000), ενώ για τον έλεγχο της συνκατακρήμνισης της p65, το ίδιο blot, έπειτα από stripping, επώαστηκε με anti-p65 πολυκλωνικό αντίσωμα (1:5000). Η ανοσοαποτύπωση έγινε με χρήση ECL και αυτοραδιογραφία. Στην παραπάνω εικόνα, η γραμμή 1 αντιστοιχεί σε εκχύλισμα επιμολυσμένων κυττάρων, η 2 και 3 (αρνητικό control) σε δείγματα στα οποία δεν προστέθηκε anti-myc (χωρίς και με σφαιρίδια στο φόρτωμα του πηκτώματος, αντίστοιχα), η 4 δεν έχει δείγμα και οι 5 και 6 σε δείγματα στα οποία η κατακρήμνιση έγινε με anti-myc (χωρίς και με σφαιρίδια στο φόρτωμα του πηκτώματος, αντίστοιχα).

## **Επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών των μεταγωγέων του παράγοντα NF-κΒ στην μεταγραφική ενεργότητα των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4.**

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των μεταγωγέων του LMP1 σήματος στο μονοπάτι σηματοδότησης του παράγοντα TGF-β που επάγεται από την έκφραση των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκαν αρνητικώς επικρατούσες (dominant negative) μορφές των πρώτων. Συγκεκριμένα, κύτταρα COS-7 συνεπιμόλυνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς του 12xCAGAluc και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4. Το αποτέλεσμα αυτής της συνεπιμόλυνσης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 22**, ήταν η αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του συνθετικού υποκινητή 12xCAGAluc κατά 36 φορές. Η επιμόλυνση των κυττάρων με τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1, προκάλεσε δραματική πτώση της ενεργοποίησης του υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4 κατά 4.2 φορές (850% σε σύγκριση με την 3600% ενεργοποίηση που επιφέρουν οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4). Η επιμόλυνση των κυττάρων με τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης TRAF2DN, προκάλεσε επίσης δραματική πτώση της ενεργοποίησης του υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4 κατά 5 φορές (700% σε σύγκριση με την 3600% ενεργοποίηση που επιφέρουν οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4). Η επιμόλυνση των κυττάρων με τον φορέα έκφρασης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης NIKDN προκάλεσε μείωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή που επέφεραν οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4 κατά 4 φορές (900% σε σύγκριση με την 3600% ενεργοποίηση από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4). Επιμόλυνση των κυττάρων με τον φορέα έκφρασης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης IκβDN, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της δραστηριότητας του υποκινητή που επιφέρουν οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4 κατά 14.4 φορές (250% σε σύγκριση με την 3600% ενεργοποίηση που επιφέρουν οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες). Τέλος, επιμόλυνση των κυττάρων COS-7 με τον φορέα έκφρασης της μεταλλαγμένης IKKβΔ34 πρωτεΐνης μείωσε την ενεργοποίηση του 12xCAGAluc από τις Smad3 και Smad4 κατά 2.2 φορές (1650% σε σύγκριση με την 3600% ενεργοποίηση που προκάλεσαν οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες). Από τα αποτελέσματα της **Εικόνας 22Α**, προκύπτει ότι οι αρνητικώς επικρατούσες μορφές των επαγωγέων του μονοπατιού του NF-κΒ δεν αναστέλλουν την καταστολή του μονοπατιού του TGF-β από την LMP1. Στην **Εικόνα 22Β** περιγράφεται η επίδραση των αρνητικώς επικρατούντων μορφών των μεταγωγέων ενεργοποίησης του NF-κΒ, στην ενεργοποίηση του 3xKBL υποκινητή από την πρωτεΐνη LMP1. Κύτταρα COS-7 συνεπιμόλυνθηκαν με το πλασμίδιο

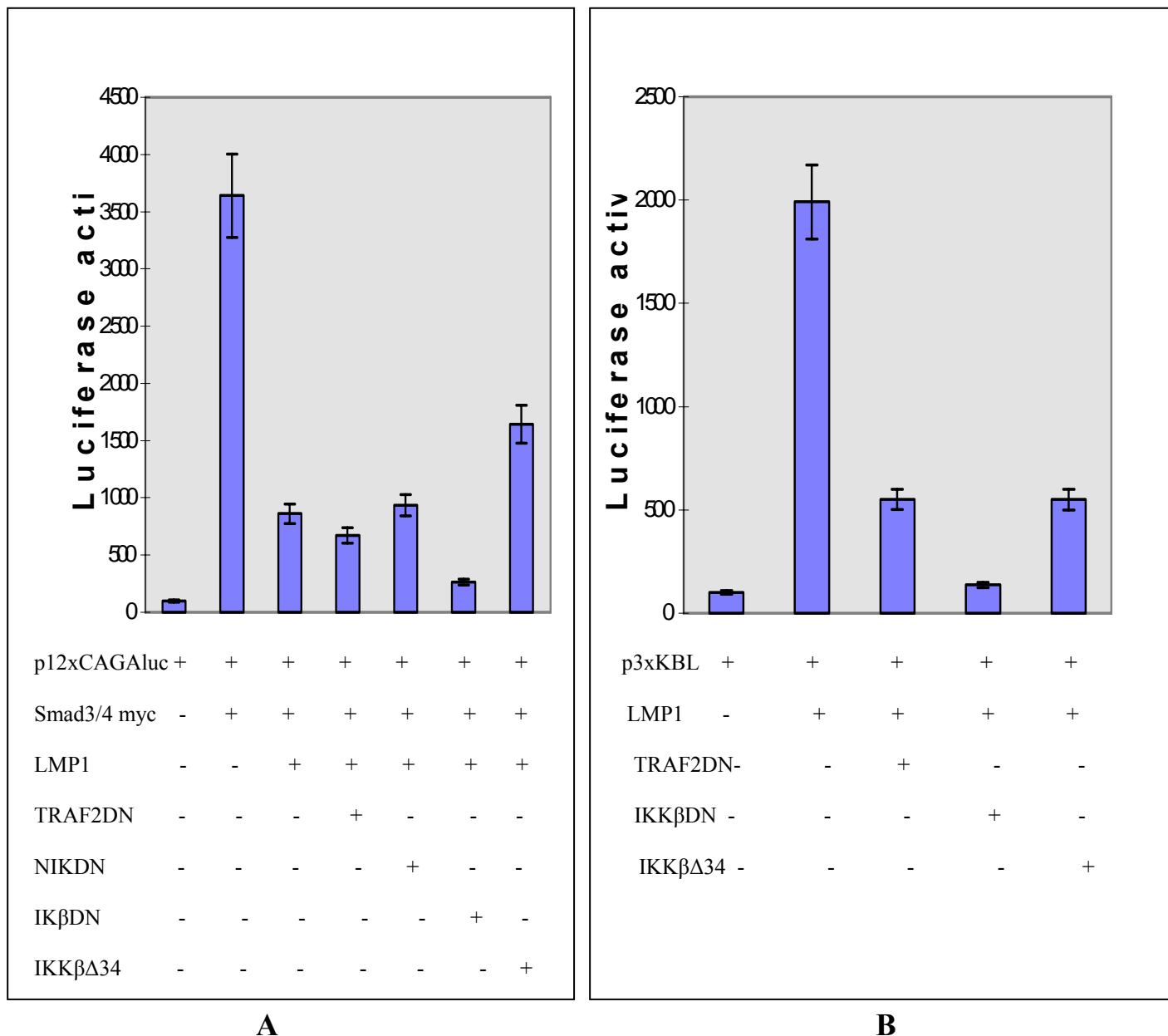
αναφοράς 3xKBL και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1. Η συνεπιμόλυνση αυτή, είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή κατά 20 φορές. Συνεπιμόλυνση των κυττάρων αυτών με τον φορέα έκφρασης της μεταλλαγμένης TRAF2DN, οδήγησε σε πτώση της ενεργοποίησης του υποκινητή 3xKBL που προκάλεσε η πρωτεΐνη LMP1, κατά 3.6 φορές (550% σε σύγκριση με την 2000% ενεργοποίηση που επιφέρει η LMP1 πρωτεΐνη). Συνεπιμόλυνση των προαναφερθέντων κυττάρων με τον φορέα έκφρασης της μεταλλαγμένης IKKβDN, αντί της TRAF2DN, προκάλεσε μεγάλη πτώση της ενεργοποίησης του υποκινητή από την LMP1, κατά 13.3 φορές (150% σε σύγκριση με την 2000% ενεργοποίηση που προκαλεί η πρωτεΐνη LMP1). Τέλος, συνεπιμόλυνση των κυττάρων με τον φορέα έκφρασης αυτή τη φορά της μεταλλαγμένης IKKβΔ34 προκάλεσε πτώση της ενεργοποίησης του υποκινητή από την LMP1 ίδια με εκείνη που προκλήθηκε από την TRAF2, δηλαδή κατά 3.6 φορές. Από τα αποτελέσματα της **Εικόνας 22B**, προκύπτει ότι, οι αρνητικώς επικρατούσες μορφές των επαγωγέων ενεργοποίησης του NF-κB από την πρωτεΐνη LMP1 αναστέλλουν αυτή τη δράση της LMP1 και αποτρέπουν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, στα κύτταρα COS-7. Συνοπτικά, το συμπέρασμα που προκύπτει από την **Εικόνα 22** είναι ότι, η LMP1 πρωτεΐνη, πιθανώς να χρησιμοποιεί εναλλακτικά ένα άλλο μονοπάτι που οδηγεί στην καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β, όταν οι μεταγωγείς του σήματος που δίνει για ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB, όντας μεταλλαγμένοι, δεν λειτουργούν.

### **Επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών των μεταγωγέων ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κB στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β.**

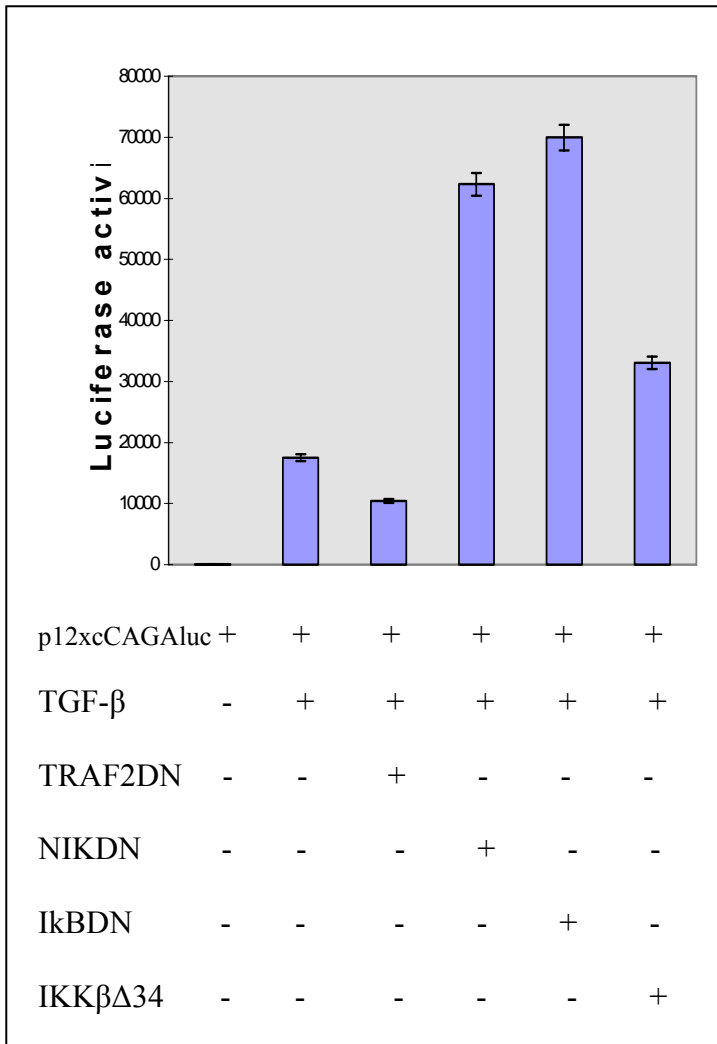
Προκειμένου να εξεταστούν οι επιπτώσεις των αρνητικώς επικρατούντων μορφών των μεταγωγέων ενεργοποίησης του NF-κB στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β πραγματοποιήθηκε αντίστοιχο πείραμα, με αυτό που περιγράφεται στην **Εικόνα 22A**. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 23A**, κύτταρα HepG2 που διαθέτουν μεγάλο αριθμό υποδοχέων του TGF-β, επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς του 12xCAGAluc. Επώαση των κυττάρων αυτών με τον παράγοντα TGF-β αύξησε την ενεργότητα του συνθετικού αυτού υποκινητή κατά 180 φορές. Συνεπιμόλυνση των κυττάρων, παρουσία του TGF-β, με τον φορέα έκφρασης της αρνητικώς επικρατούσας μορφής TRAF2DN, προκάλεσε μείωση της ενεργότητας που προσέδωσε ο TGF-β στον συνθετικό υποκινητή, κατά 1.8 φορές (1000% σε σύγκριση

με την 18000% ενεργοποίηση από τον TGF-β). Συνεπιμόλυνση των κυττάρων, παρουσία του TGF-β, με την αρνητικώς επικρατούσα πρωτεΐνη NIKDN, οδήγησε σε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας που προσέδωσε ο παράγοντας TGF-β στον υποκινητή 12xCAGAluc, κατά 3.4 φορές (61500% σε σύγκριση με 18000% αύξηση από τον TGF-β). Αρκετά σημαντική αύξηση στην δραστηριότητα του υποκινητή, παρουσία του TGF-β, παρατηρήθηκε και με την επιμόλυνση των κυττάρων HepG2, με την αρνητικώς επικρατούσα πρωτεΐνη IkBDN, κατά 3.9 φορές ( 70000% σε σύγκριση με την 18000% αύξηση που προσδίδει ο TGF-β). Μικρότερη αύξηση στην δραστηριότητα του ήδη ενεργοποιημένου με TGF-β υποκινητή, κατά 1.8 φορές, προσέδωσε η επιμόλυνση των HepG2 κυττάρων με την αρνητικώς επικρατούσα πρωτεΐνη IKKβΔ34 (33000% σε σύγκριση με την 18000% από τον TGF-β). Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στην υπόθεση ότι ακόμα και αν υπάρχει εναλλακτικό μονοπάτι που χρησιμοποιείται από την πρωτεΐνη LMP1 για την αναστολή της σηματοδότησης του TGF-β, ο NF-κΒ πρέπει να παίζει ρόλο στην αναστολή αυτή στα HepG2 κύτταρα, καθώς οι αρνητικώς επικρατούσες μορφές των επαγωγέων ενεργοποίησής του, επιτρέπουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού του TGF-β, αυξάνοντας την μεταγραφική δραστηριότητα παρουσία του.

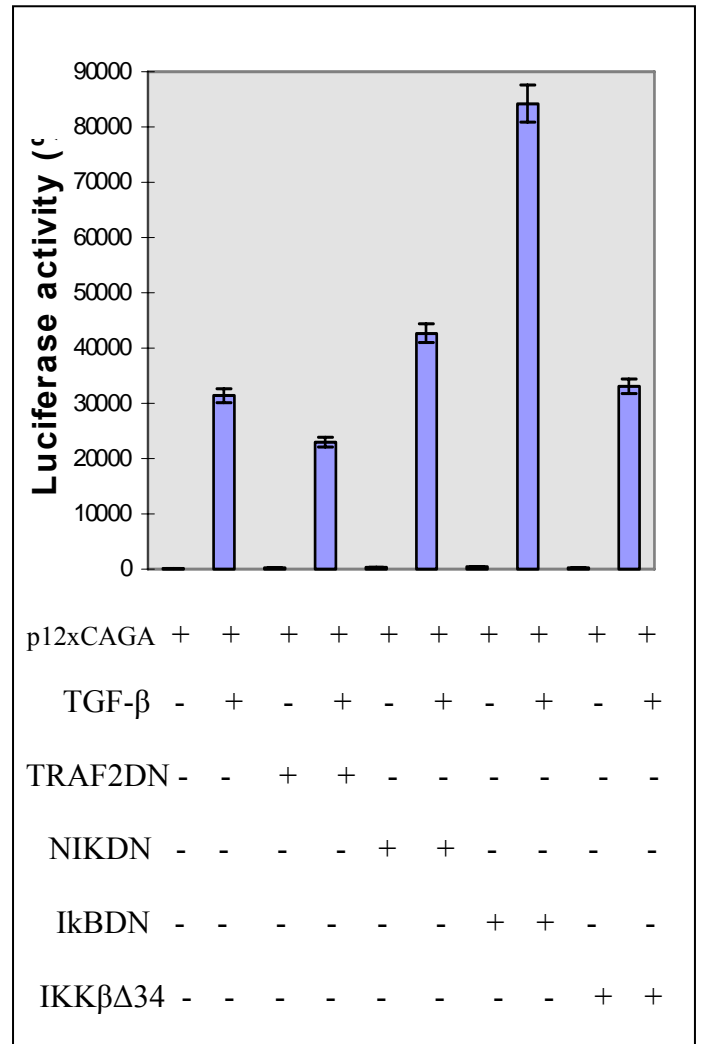
Προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι παρατηρήσεις αυτές, το πείραμα επαναλήφθηκε, παρουσία αλλά και απουσία του παράγοντα TGF-β, όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 23B**. Παρουσία του TGF-β, υπήρχε πλήρης επαναληψιμότητα του πειράματος της Εικόνας 23A. Έτσι, η παρουσία του TGF-β επέφερε αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του συνθετικού υποκινητή κατά 300 φορές. Η αύξηση αυτή μειώθηκε με την συνέκφραση της αρνητικώς επικρατούσας πρωτεΐνης TRAF2DN κατά 1.4 φορές (22000% έναντι της 30000% ενεργοποίησης από τον TGF-β). Ωστόσο, η δραστηριότητα του συνθετικού υποκινητή 12xCAGAluc, παρουσία του TGF-β, αυξήθηκε περαιτέρω με την έκφραση των αρνητικώς επικρατούντων μορφών NIKDN, ή IkBDN κατά 1.4 και 2.8 φορές αντίστοιχα, ενώ παρέμεινε σταθερή όταν εκφράστηκε η IKKβΔ34, παρουσία TGF-β, σε κύτταρα HepG2. Απουσία του TGF-β, καμμία από τις αρνητικώς επικρατούσες μορφές των επαγωγέων του NF-κΒ δεν είχε επίδραση στον συνθετικό υποκινητή που χρησιμοποιήσαμε. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 23B** συμφωνούν με εκείνα της **23A**, και μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ παίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β, αφού η μη ενεργοποίησή του επιτρέπει και συνεπικουρεί την σηματοδότηση του TGF-β.



**Εικόνα 22.** Επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών των μεταγωγέων του NF-κB μονοπατιού στην μεταγραφική ενεργότητα του συμπλόκου των πρωτεϊνών Smad3myc και Smad4myc. **A.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p12xCAGAluc (3 μg) και το πλασμίδιο συμπλήρωσης pUC19. Χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pcDNAIampSmad3myc (2 μg), pcDNAIampSmad4myc (2 μg), pSG5LMP1wt (2 ng), καθώς και pcDNA3FLAG TRAF2DN (2 μg), pcDNA3FLAG NIKDN(2 μg), pCMVIκβDN (2 μg) και pcDNA3FLAG IKKβΔ34 (2 μg), όπως περιγράφεται στο γράφημα A. **B.** Αντίστοιχη επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε σε COS-7 κύτταρα με πλασμιδιακό φορέα αναφοράς τον p3xKBL (2 μg). Στο πείραμα αυτό δεν χρησιμοποιήθηκαν οι φορείς έκφρασης των Smad3myc και Smad4myc. Οι φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα καταδεικνύονται στο γράφημα B. Και στις δύο περιπτώσεις η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται με τη μορφή ραβδογραμμάτων στα αντίστοιχα γραφήματα. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από το πλασμίδιο pCMVβ-gal (2 μg), με το οποίο επιμολύνθηκαν τα αναλυόμενα δείγματα.



**A**



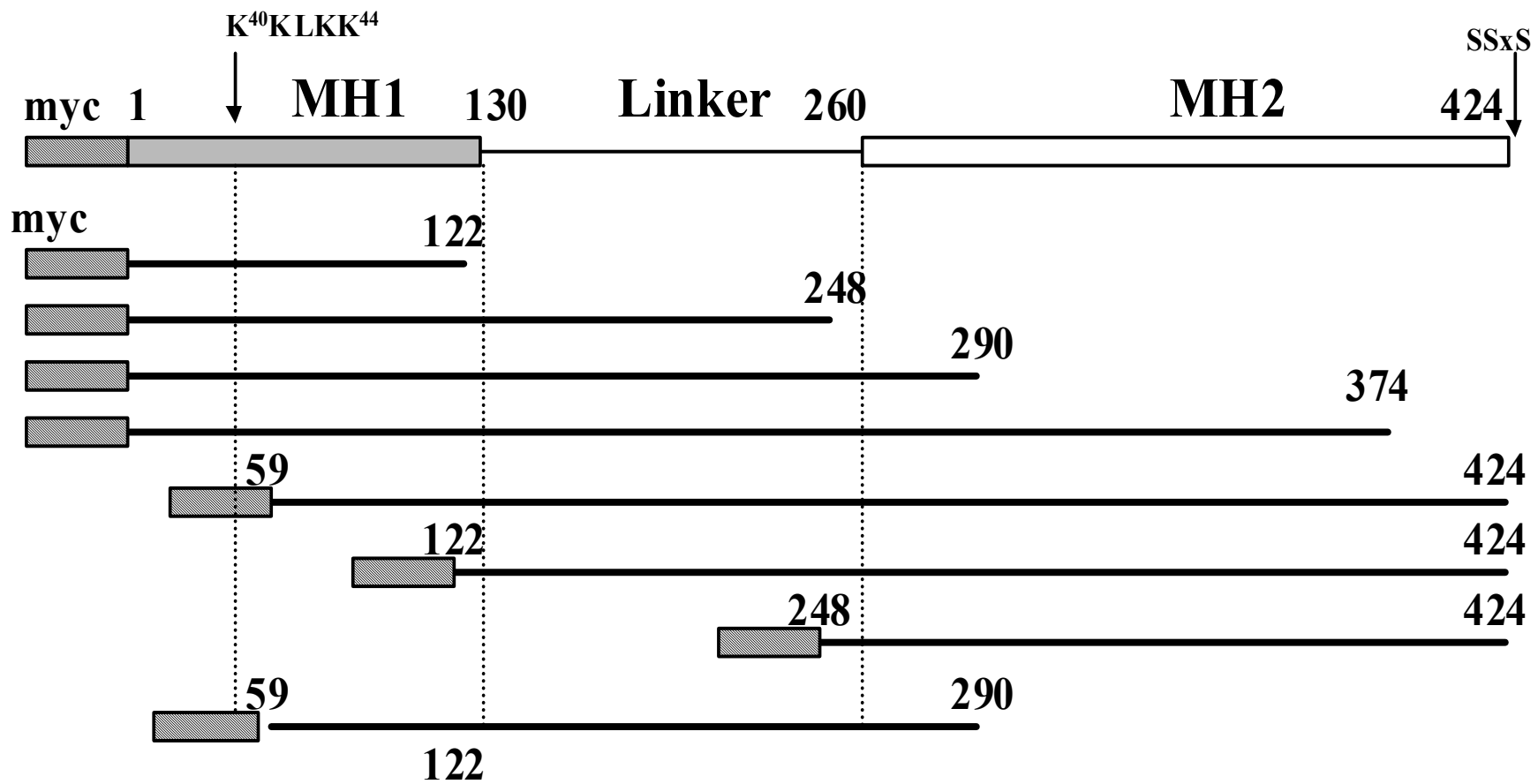
**B**

**Εικόνα 23.** Επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών των μεταγωγέων του NF-κB στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β. **A.** Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p12xCAGAluc (2 μg), και του πλασμιδίου συμπλήρωσης pBS, παρουσία του παράγοντα TGF-β (400 pM). Ο TGF-β προστέθηκε με την ανανέωση του θρεπτικού υλικού, 16 ώρες μετά την επιμόλυνση, και η επώαση των κυττάρων συνεχίστηκε, παρουσία του, για άλλες 24 ώρες. Χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια έκφρασης pcDNA3FLAG TRAF2DN (2 μg), pcDNA3FLAG NIKDN(2 μg), pCMV IκBDN (2 μg) και pcDNA3FLAG IKKβΔ34 (2 μg), όπως περιγράφεται στο γράφημα A. **B.** Αντίστοιχη επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε σε HepG2 κύτταρα, απουσία ή παρουσία του παράγοντα TGF-β (400 pM). Οι φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα υποδηλώνονται στο γράφημα B. Και στις δύο περιπτώσεις η % δρατικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση παρουσιάζεται με τη μορφή ραβδογραμμάτων στα αντίστοιχα γραφήματα. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, για την οποία όλα τα αναλυόμενα δείγματα επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pCMVβ-gal (2 μg).



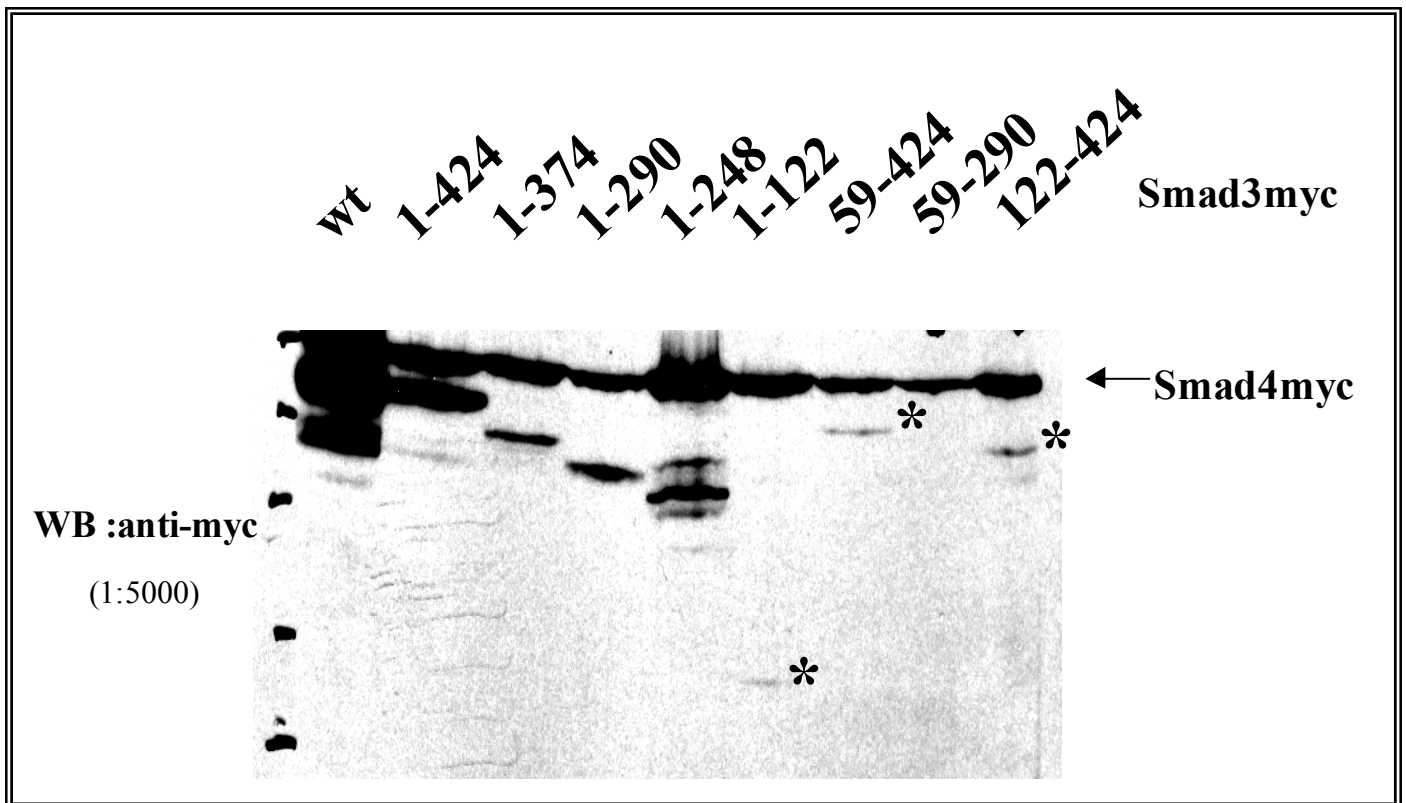
### **Δομική και λειτουργική ανάλυση της πρωτεΐνης Smad3.**

Για τη μελέτη των δομικών και λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης Smad3, κατασκευάστηκαν 8 διαφορετικά πλασμίδια που εκφράζουν διαφορετικές ελλειμματικές μορφές της πρωτεΐνης Smad3. Στην **Εικόνα 24** δίνεται η σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών της αγρίου τύπου πρωτεΐνης Smad3 καθώς και των 8 μεταλλαγμένων μορφών της. Στην αγρίου τύπου πρωτεΐνη περιέχονται οι περιοχές MH1 και MH2 και η περιοχή σύνδεσής τους. Στο αμινοτερματικό άκρο υπάρχει η αλληλουχία K<sup>40</sup>KLKK<sup>44</sup> που αποτελεί το σήμα πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης (NLS), ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο περιέχεται το μοτίβο SSxS που φωσφορυλιώνεται από τον υποδοχέα του TGF-β, τύπου I, και οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Smad3, όπως περιγράφεται στην Εισαγωγή. Έχει ήδη αναφερθεί ότι η περιοχή MH1 ευθύνεται για την πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 στο DNA, ενώ η περιοχή MH2 για την ενεργότητά της στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων. Από τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, η Smad3 (1-374) στερείται μέρους της MH2 περιοχής και του μοτίβου SSxS, με αποτέλεσμα την μη φωσφορυλίωσή της από τον υποδοχέα του TGF-β, και συνεπώς την χαμηλή λειτουργικότητά της στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β. Η Smad3 (1-290) πρωτεΐνη στερείται ακόμα μεγαλύτερης περιοχής της MH2, από ότι η Smad3 (1-374), και συνεπώς αναμένεται να χαρακτηρίζεται από ακόμα μικρότερη δραστηριότητα. Η πρωτεΐνη Smad3 (1-248) στερείται ολόκληρης της περιοχής MH2, ενώ η πρωτεΐνη Smad3 (1-122) χαρακτηρίζεται από έλλειμμα και της MH2 και της περιοχής σύνδεσης των MH1 και MH2. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Smad3 (59-424) δεν περιέχει την περιοχή όπου εντοπίζεται το NLS (αμινοξέα 40-44). Η πρωτεΐνη Smad3 (122-424) χαρακτηρίζεται από έλλειμμα ολόκληρης της περιοχής MH1, ενώ η πρωτεΐνη Smad3 (248-424) από έλλειμμα και της περιοχής MH1 και της περιοχής σύνδεσης. Τέλος, η πρωτεΐνη Smad3 (59-290), σε αντίθεση με τις προηγούμενες που είναι ελλειμματικές (truncated) είτε στο αμινοτερματικό είτε στο καρβοξυτελικό άκρο τους, είναι διπλά truncated, καθώς στερείται του NLS της αμινοτερματικής περιοχής και του μεγαλύτερου μέρους της MH2 περιοχής.

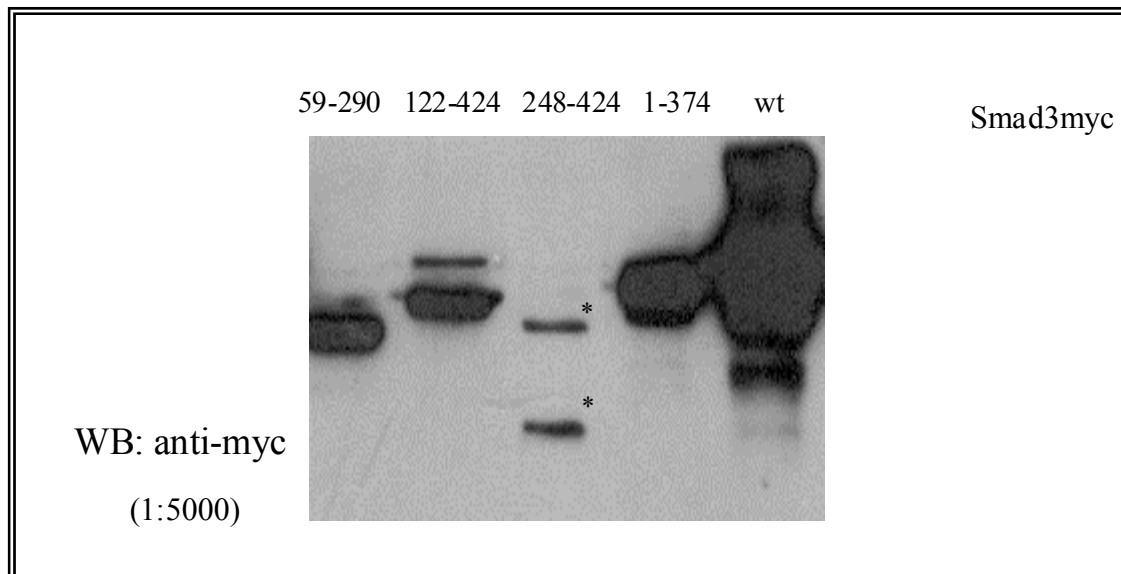


**Εικόνα 24.** Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης που κατασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή

Πριν προχωρήσουμε στην ανάλυση της λειτουργικότητας των μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης Smad3, ελέγξαμε την έκφρασή τους. Η **Εικόνα 25** και η **Εικόνα 26** δείχνουν την έκφραση των μεταλλαγμένων αυτών πρωτεϊνών. Η χαμηλή έκφραση των Smad3 (1-122), Smad3 (59-424) και Smad3 (59-290) πρωτεϊνών (βλ.αστερίσκοι Εικόνας 25) οφείλεται, πιθανότατα, στην ταχύτατη αποικοδόμηση των μικρών αυτών πρωτεϊνών, μέσω ουμπικιτινίωσής τους, και όχι στην ποιότητα των πλασμιδιακών φορέων έκφρασής τους. Επιπλέον, στην Εικόνα 26 δείχνεται το περίεργο πρότυπο έκφρασης της Smad3 (248-424), το οποίο επαναλαμβανόταν σε κάθε ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης, και ίσως οφείλεται επίσης, σε πρωτεόλυση της πρωτεΐνης και τη διάσπασή της σε δύο πεπτίδια (βλ. αστερίσκος Εικόνας 26).



**Εικόνα 25.** Ανίχνευση της πρωτεϊνικής έκφρασης της Smad3 καθώς και μεταλλαγμένων μορφών της. Κύτταρα COS-7 συνεπιμολύνθηκαν με τους φορείς πλασμιδιακής έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3myc (συμβολίζεται ως wt), Smad4myc, καθώς και μεταλλαγμένων μορφών της πρώτης, οι οποίες φέρουν επίσης τον επίτοπο myc. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια έκφρασης pcDNAIampSmad3mycwt, pcDNAIampSmad4myc, pcDNAIampSmad3 myc (1-424), pcDNAIampSmad3 myc (1-122), pcDNAIampSmad3 myc (1-248), pcDNAIampSmad3 myc (1-290), pcDNAIampSmad3 myc (1-374), pcDNAIampSmad3 myc (59-424), pcDNAIampSmad3 myc (122-424), pcDNAIampSmad3 myc (248-424), και pcDNAIampSmad3myc(59-290) (ποσότητα 10 µg από το κάθε ένα), καθώς και το πλασμίδιο συμπλήρωσης pBS (pBluescript K+) (10 µg). Η ανανέωση του θρεπτικού έγινε 16 ώρες κατά την επιμόλυνση και ακολούθηκε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Μετά τις εκπλύσεις με διάλυμα PBS, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση, ίσης ποσότητας από κάθε δείγμα πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, σε 12% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS/PAGE), και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western blotting). Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα mouse anti-myc (1:1000), anti-mouse HRP (1:10000), το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού ECL, και αυτοραδιογραφία.



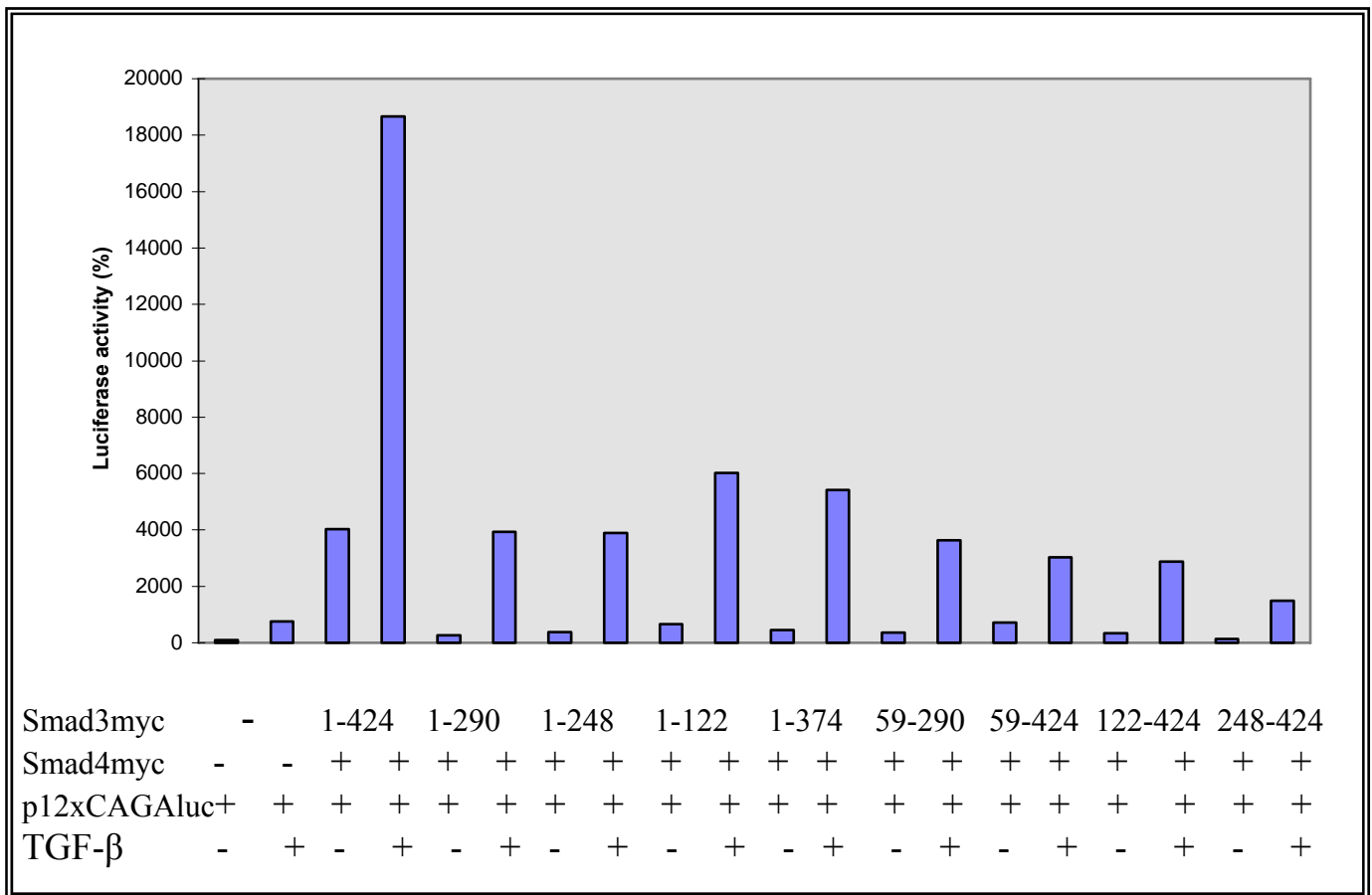
**Εικόνα 26.** Ανίχνευση της πρωτεϊνικής έκφρασης της Smad3 καθώς και μεταλλαγμένων μορφών της. Κύτταρα COS-7 συνεπιμολύνθηκαν με τους φορείς πλασμιδιακής έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3myc (συμβολίζεται ως wt, Smad4FLAG, καθώς και μεταλλαγμένων μορφών της πρώτης, οι οποίες φέρουν επίσης τον επίτοπο myc και φαίνονται στην παραπάνω εικόνα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο έκφρασης pcDNAIampSmad4FLAG με το πλασμίδιο pcDNAIampSmad3myc wt, ή το pcDNAIampSmad3 myc (1-374), ή το pcDNAIampSmad3 myc (248-424), ή το pcDNAIampSmad3 myc (122-424) ή το pcDNAIampSmad3myc(59-290) (ποσότητα 10 µg από το κάθε ένα). Η αλλαγή του θρεπτικού έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Μετά τις εκπλύσεις με διάλυμα PBS, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση, ίσης ποσότητας από κάθε δείγμα πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, σε 12% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS/PAGE), και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western blotting). Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα mouse anti-myc (1: 1000), anti-mouse HRP (1:10000), το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού ECL, και αυτοραδιογραφία. Οι αστερίσκοι δείχνουν τα δύο πεπτίδια που ανιχνεύονται σε εκχυλίσματα κυττάρων COS-7, επιμολυσμένων με την κατασκευή pcDNAIampSmad3 myc (248-424).

## **Ανάλυση της μεταγραφικής ενεργότητας της πρωτεΐνης Smad3 και των μεταλλαγμένων μορφών της.**

Προκειμένου να χαρτογραφηθούν οι περιοχές του μορίου της Smad3 πρωτεΐνης που είναι υπεύθυνες για την μεταγραφική της ενεργότητα, κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς 12xCAGAluc, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 27**. Η επώαση των κυττάρων με τον TGF-β (400 pM) για 24 ώρες, αύξησε τη δραστικότητα του υποκινητή κατά 5 φορές. Η συνεπιμόλυνση των κυττάρων με τους φορείς έκφρασης των αγρίου τύπου πρωτεϊνών Smad3 και Smad4, παρουσία TGF-β, αύξησε την ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή από τον TGF-β κατά 37 φορές (18500% σε σύγκριση με την 500% ενεργοποίηση που επιφέρει ο παράγοντας TGF-β). Επιμόλυνση των κυττάρων με τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης Smad3(1-290) ή της Smad3(1-248) και Smad4, παρουσία του TGF-β προκάλεσε αύξηση της δραστικότητας που επέφερε ο TGF-β στον υποκινητή, κατά 8 φορές (4000% ενεργοποίηση σε σχέση με την 500% ενεργοποίηση του υποκινητή που προκαλεί μόνος του ο TGF-β). Η επώαση των κυττάρων με TGF-β και η επιμόλυνσή τους με τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης Smad3(1-122) ή της Smad3(1-374) και Smad4, προκάλεσε επίσης αύξηση της δραστικότητας που επέφερε ο TGF-β στον υποκινητή, κατά 12 και 10.5 φορές αντίστοιχα (6000% και 5250% ενεργοποίηση σε σχέση με την 500% ενεργοποίηση του υποκινητή που προκαλεί μόνος του ο TGF-β). Η επιμόλυνση των HepG2 κυττάρων με τον φορέα της πρωτεΐνης Smad3(59-290) και της Smad4, παρουσία του TGF-β, προκάλεσε αύξηση της δραστικότητας που επέφερε ο TGF-β στον υποκινητή, κατά 7 φορές (3500% ενεργοποίηση σε σχέση με την 500% ενεργοποίηση του υποκινητή που προκαλεί μόνος του ο TGF-β). Η χρησιμοποίηση των φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3(59-424) ή Smad3(122-424) και της Smad4, παρουσία του TGF-β, προκάλεσε αύξηση της δραστικότητας που επέφερε ο TGF-β στον υποκινητή, κατά 6 φορές (3000% ενεργοποίηση σε σχέση με την 500% ενεργοποίηση του υποκινητή που προκαλεί μόνος του ο TGF-β). Τέλος, η επιμόλυνση των κυττάρων με τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3(248-424) και Smad4, παρουσία του παράγοντα TGF-β, οδήγησε σε αύξηση της ενεργοποίησης του συνθετικού υποκινητή από τον TGF-β κατά 2.5 φορές (1250% ενεργοποίηση σε σύγκριση με την 500% ενεργοποίηση που επιφέρει μόνος του ο TGF-β). Οι αντίστοιχες επιμολύνσεις με τους φορείς των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών που προαναφέρθηκαν, απουσία TGF-β, επέφεραν ελάχιστη αύξηση στην δραστικότητα

του υποκινητή, με μόνη εξαίρεση την επιμόλυνση με τους φορείς έκφρασης των αγρίου τύπου Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών. Η επιμόλυνση αυτή επέφερε αύξηση στην ενεργότητα του υποκινητή κατά 40 φορές.

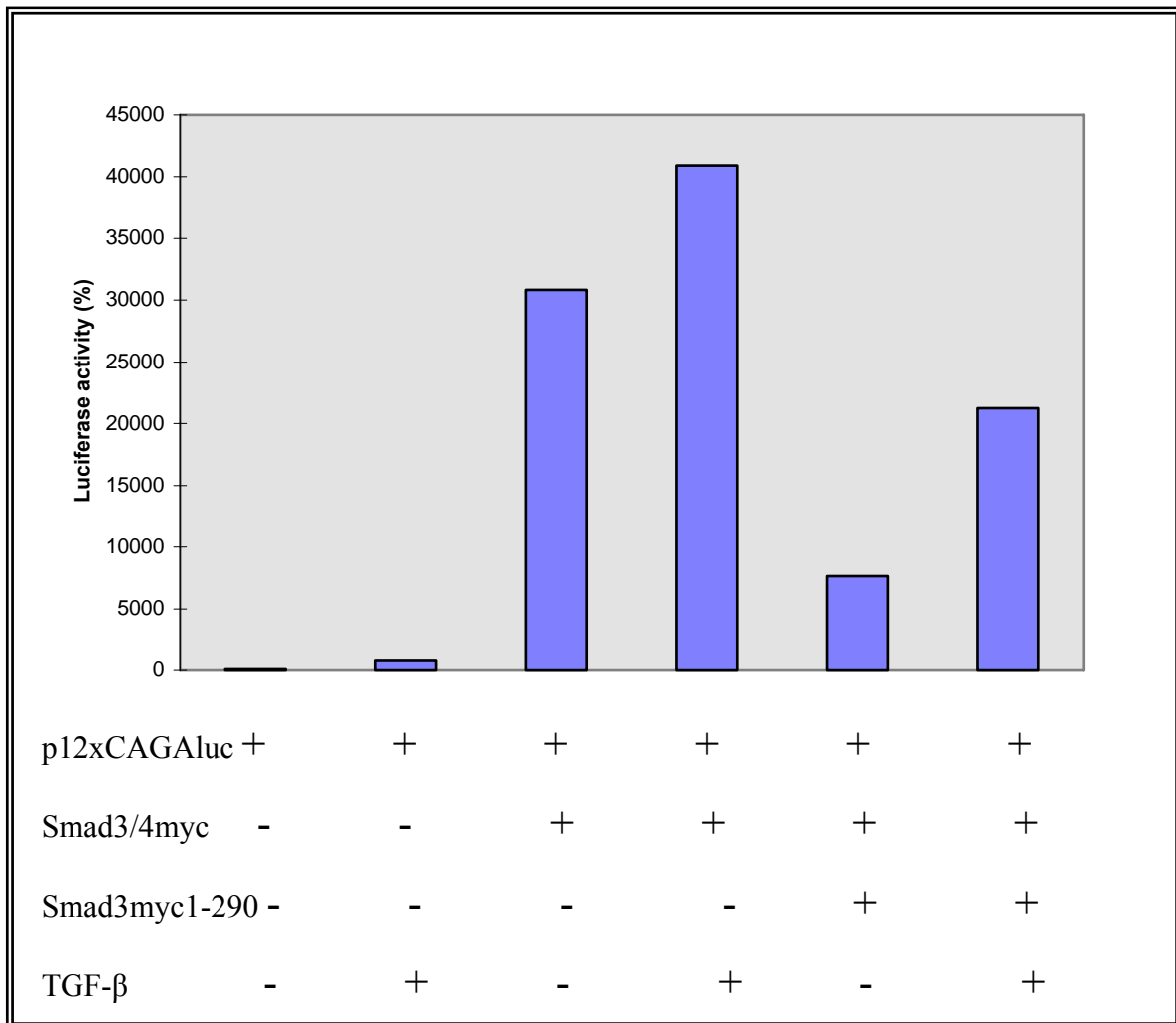
Από την **Εικόνα 27** προκύπτει ότι όλες οι μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 πρωτεΐνης ενεργοποιούν τον συνθετικό υποκινητή 12xCAGAluc πολύ λιγότερο από ότι η αγρίου τύπου πρωτεΐνη Smad3, παρουσία TGF- $\beta$ . Απουσία TGF- $\beta$  η ενεργότητα των μεταλλαγμένων μορφών είναι επίσης μικρότερη σε σχέση με την αγρίου τύπου Smad3. Αυτό ήταν αναμενόμενο για τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, από τις οποίες λείπει η περιοχή ενεργότητας MH2. Ήταν επίσης αναμενόμενο για τις μεταλλαγμένες μορφές από τις οποίες λείπει η περιοχή πρόσδεσης στο DNA, MH1. Για την μεταλλαγμένη μορφή της Smad3, την Smad3(59-424) όμως δεν ήταν αναμενόμενη αυτή η μειωμένη δραστηριότητα, καθώς διαθέτει και την MH1 και την MH2 και την περιοχή σύνδεσης ανάμεσά τους. Στην περίπτωση των HepG2 κυττάρων, φαίνεται ότι το σήμα NLS που εντοπίζεται στα αμινοξέα 40-44, είναι σημαντικό για την μεταφορά της Smad3 στον πυρήνα, όπου ασκεί την μεταγραφική της δράση. Ένα μέρος της παρατηρούμενης ενεργότητας των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης, μπορεί να οφείλεται στην Smad4 πρωτεΐνη, που παρουσία TGF- $\beta$  και σε συνεργασία με την ενδογενή, αγρίου τύπου Smad3 πρωτεΐνη, επιφέρει την μεταγραφική ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή.



**Εικόνα 27.** Μεταγραφική ενεργότητα της πρωτεΐνης Smad3 και των μεταλλαγμένων μορφών της. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p12xCAGAluc (2 µg) και το πλασμίδιο συμπλήρωσης pUC19, παρουσία (400 pM) ή απουσία του παράγοντα TGF-β. Στην επιμόλυνση, ως φορείς έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pcDNAIamp Smad4myc, pcDNAIamp Smad3myc(1-424) (wt), pcDNAIamp Smad3myc(1-290), pcDNAIamp Smad3myc(1-248), pcDNAIamp Smad3myc(1-122), pcDNAIamp Smad3myc(1-374), pcDNAIamp Smad3myc(59-290), pcDNAIamp Smad3myc(59-424), pcDNAIamp Smad3myc(122-424) και pcDNAIampSmad3myc(248-424), που εκφράζουν τις πρωτεΐνες Smad4myc, Smad3myc αγρίου τύπου και μεταλλαγμένες Smad3myc (ποσότητα 2 µg από κάθε πλασμίδιο έκφρασης). Η % δρατικότητα του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράµματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 µg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει αρνητικώς επικρατούσα δράση μεταξύ της αγρίου τύπου Smad3 και μεταλλαγμένης μορφής Smad3(1-290), πραγματοποιήθηκε η ανάλυση που περιγράφεται στην **Εικόνα 28**. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p12xCAGAluc. Επώαση των κυττάρων αυτών με τον παράγοντα TGF-β (400 pM) για 24 ώρες, οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητας του υποκινητή κατά 5 φορές. Επιμόλυνση των κυττάρων με τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4, απουσία του TGF-β, αύξησε την ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή κατά 310 φορές, ενώ η ίδια επιμόλυνση παρουσία του TGF-β αύξησε την ενεργοποίηση που προσέδωσε ο TGF-β στον υποκινητή κατά 82 φορές (4100% ενεργοποίηση σε σύγκριση με την 500% ενεργοποίηση από τον TGF-β μόνο του). Η συνεπιμόλυνση των προαναφερθέντων κυττάρων και με τον φορέα έκφρασης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Smad3 (1-290), απουσία TGF-β, προκάλεσε πτώση της ενεργοποίησης του υποκινητή που επέφερε η έκφραση των Smad3 και Smad4 κατά 4.1 φορές (7500% ενεργοποίηση σε σχέση με την 31000% ενεργοποίηση που προκάλεσε η έκφραση των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4). Η αντίστοιχη συνεπιμόλυνση παρουσία του TGF-β, προκάλεσε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του 12xCAGAluc που του είχαν προσδώσει οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4 παρουσία του TGF-β, κατά 1.95 φορές (21000% ενεργοποίηση σε σχέση με την 41000% ενεργοποίηση που επιφέρουν οι Smad3, Smad4 και TGF-β). Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 28** δείχνουν ότι τόσο παρουσία, όσο και απουσία του TGF-β, η συνέκφραση της μεταλλαγμένης Smad3(1-290) με την αγρίου τύπου Smad3 πρωτεΐνη, μειώνει την μεταγραφική ενεργοποίηση που επιφέρει η δεύτερη. Καθώς η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη έχει ακέραια την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, ενδέχεται να προσδένεται αυτή στον συνθετικό υποκινητή, εμποδίζοντας την πρόσδεση της αγρίου τύπου Smad3. Επειδή, όμως δεν έχει ακέραια την περιοχή MH2, η μεταγραφική ενεργοποίηση που προκαλεί στον υποκινητή είναι πολύ χαμηλότερη από εκείνη που θα προσέδιδε η αγρίου τύπου Smad3. Βεβαίως, η υπόθεση αυτή θα πρέπει να ελεγχθεί και πειραματικά, με ανάλυση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του συμπλόκου της πρωτεΐνης με το DNA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), ώστε να αποδειχθεί η πρόσδεση της Smad3(1-290) στον συνθετικό υποκινητή που χρησιμοποιήσαμε.



**Εικόνα 28.** Ανταγωνισμός μεταξύ της αγρίου τύπου πρωτεΐνης Smad3myc και της μεταλλαγμένης μορφής της, Smad3myc(1-290), για την πρόσδεση σε περιοχές ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Κύτταρα HepG2 συνεπιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς p12xCAGAluc (2 μg) και πλασμίδιου συμπλήρωσης pUC19 παρουσία (400 pM) ή απουσία του παράγοντα TGF-β. Χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια έκφρασης pcDNAIampSmad3myc (2 μg), pcDNAIampSmad4myc (2 μg) και pcDNAIampSmad3myc(1-290) (2 μg), όπως περιγράφεται στο γράφημα. Κάθε μείγμα επιμόλυνσης περιείχε και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης, pCMVβ-gal (2 μg). Ο παράγοντας TGF-β προστέθηκε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για άλλες 24 ώρες. Η % δραστικότητα του ενζύμου λουσιφεράση σε κάθε δείγμα δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### **Ανταγωνισμός μεταξύ των μονοπατιών σηματοδότησης της πρωτεΐνης LMP1 και του παράγοντα TGF-β.**

Όπως δείχνουν τα πειραματικά αποτελέσματα των Εικόνων 6 και 7, σε κύτταρα COS-7 παρατηρείται αμοιβαία αναστολή ανάμεσα στα σηματοδοτικά μονοπάτια της λανθάνουσας μεμβρανικής πρωτεΐνης 1, LMP1 του ιού EBV, και του μετασχηματίζοντος αυξητικού παράγοντα β, TGF-β. Το μονοπάτι που χρησιμοποιεί η πρωτεΐνη LMP1 προκειμένου να ενεργοποιήσει τον παράγοντα NF-κB φαίνεται, ακολούθως, να αναστέλλει το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β που επάγει την αναστολή της κυτταρικής αύξησης. Το μονοπάτι του TGF-β φαίνεται με τη σειρά του να αναστέλλει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και συνεπώς, το μονοπάτι σηματοδότησης που χρησιμοποιεί η πρωτεΐνη LMP1. Ο ανταγωνισμός ανάμεσα στα δύο μονοπάτια μπορεί να είναι είτε άμεσος, είτε έμμεσος.

Στην περίπτωση άμεσου ανταγωνισμού, η αμοιβαία αναστολή των δύο μονοπατιών μπορεί να συμβαίνει είτε στο επίπεδο του κυτταροπλάσματος, είτε στο επίπεδο του πυρήνα. Στο επίπεδο του κυτταροπλάσματος, η ενεργότητα του υποδοχέα του TGF-β μπορεί να προκαλεί την φωσφορύλιωση του NF-κB και την απενεργοποίησή του. Εναλλακτικά, είναι πιθανό να συμβαίνει απευθείας ένωση του παράγοντα NF-κB με την πρωτεΐνη Smad3 και η αλληλεπίδραση αυτή να καλύπτει το σήμα κυτταρικού εντοπισμού NLS της δεύτερης, με αποτέλεσμα την αναστολή της εισόδου της στον πυρήνα και την μη μετάδοση του σήματος του παράγοντα TGF-β. Τα στοιχεία που προκύπτουν από το πείραμα της *in vivo* αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών p65 και Smad3 (Co-IP), της Εικόνας 21, είναι ενδεικτικά της ισχύος της παραπάνω υπόθεσης, αλλά χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Στην περίπτωση που τα δύο μονοπάτια συναντιούνται και ανταγωνίζονται άμεσα στο επίπεδο του πυρήνα, το φαινόμενο της αμοιβαίας αναστολής μπορεί να οφείλεται στην προσέλκυση παραγόντων, αναγκαίων για την μεταγραφή, είτε από την πρωτεΐνη Smad3 είτε από τον παράγοντα NF-κB (φαινόμενο *squelching*). Αναλυτικότερα, είναι πιθανόν η πρωτεΐνη p65 που όπως έχει δειχθεί ενώνεται με τον παράγοντα p300/CBP (57), να τον προσελκύει και να τον χρησιμοποιεί στην

ενεργοποίηση της μεταγραφής από τις ρυθμιστικές περιοχές στις οποίες προσδένεται. Κατά αυτόν τον τρόπο, μπορεί να αναστέλλεται η ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που ρυθμίζονται από την πρωτεΐνη Smad3, καθώς για την ενεργοποίηση αυτή, όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, απαιτείται και πάλι ο μεταγραφικός συνενεργοποιητής p300/CBP. Τα χαμηλά επίπεδα του p300/CBP στα κύτταρα, μπορεί να μην επαρκούν για την ενεργοποίηση και των δύο μονοπατιών, οπότε η χρησιμοποίησή του, είτε από την p65, είτε από την Smad3, να αναστέλλει τη δυνατότητα χρησιμοποίησής του από την άλλη. Αυτό βεβαίως, μπορεί να ισχύει για τα πειράματα της συγκεκριμένης διατριβής, όπου χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά οι ρυθμιστικές περιοχές όπου προσδένονται και επάγουν μεταγραφική ενεργοποίηση οι πρωτεΐνες Smad3 και p65. Είναι, ωστόσο πιθανό, η ταυτόχρονη επιμόλυνση των κυττάρων COS-7 με πλασμίδια αναφοράς και των δύο υποκινητών όπου προσδένονται οι πρωτεΐνες Smad και p65, να έχει ως αποτέλεσμα, όχι φαινόμενο squelching και αμοιβαία αναστολή, αλλά συνεργιστική δράση των πρωτεϊνών και μεταγραφική ενεργοποίηση, μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται στις μεμονωμένες επιμολύνσεις.

Ένας μηχανισμός έμμεσου ανταγωνισμού των μονοπατιών της LMP1 και των Smad, που έχει ήδη προταθεί στη βιβλιογραφία, αφορά στην δράση της ανασταλτικής πρωτεΐνης Smad7. Η Smad7 εμποδίζει την φωσφορυλίωση των R-Smad και συνεπώς και της πρωτεΐνης Smad3, αναστέλλοντας το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β. Έχει δειχθεί ότι η Smad7 πρωτεΐνη ενεργοποιείται από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα δύο μονοπάτια σχετίζονται έμμεσα (56, 58). Εξάλλου, τα αποτελέσματα των πειραμάτων με την χρήση μεταλλαγμένων μορφών των επαγωγέων σηματοδότησης του NF-κB, ενισχύουν την υπόθεση της έμμεσης αλληλεπίδρασης των δυο μονοπατιών. Συγκεκριμένα, οι αρνητικώς επικρατούσες μορφές των επαγωγέων του NF-κB δεν κατόρθωσαν να αναστείλλουν την καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης του TGF, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της Εικόνας 22, ενώ ανέστειλαν αποτελεσματικά την ενεργοποίηση του NF-κB. Το γεγονός αυτό, οδηγεί στην υπόθεση ότι η πρωτεΐνη LMP1, μπορεί εναλλακτικά να χρησιμοποιεί ένα άλλο μονοπάτι για την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας των Smad πρωτεϊνών, δηλαδή για την καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β. Το γεγονός, βέβαια, ότι οι αγρίου τύπου μεταγωγείς του NF-κB, σε μεγάλες συγκεντρώσεις καταστέλλουν το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β, (Εικόνα 14) αποτελεί στοιχείο που συνηγορεί υπέρ της υπόθεσης ότι η πρωτεΐνη LMP1

χρησιμοποιεί το μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB για την καταστολή του TGF-β μονοπατιού. Συνοπτικά, το συμπέρασμα που προκύπτει από τις προαναφερθείσες παρατηρήσεις, είναι ότι η LMP1 πρωτεΐνη, στα κύτταρα COS-7, μπορεί να χρησιμοποιεί το μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB, ή εναλλακτικά, ένα άλλο, άγνωστο μέχρι τώρα μονοπάτι, για την καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης του TGF-β. Στα κύτταρα COS-7, παρατηρείται και το αντίστροφο φαινόμενο, δηλαδή η καταστολή του μονοπατιού ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κB, από το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β.

**Περιοχές της πρωτεΐνης LMP1 που απαιτούνται για την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB και την καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης του παράγοντα TGF-β.**

Τα αποτελέσματα της Εικόνας 9 ενισχύουν την υπόθεση του άμεσου ανταγωνισμού των δύο μονοπατιών, καθώς ακόμα και χαμηλές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης LMP1 απενεργοποιούν κατά 50% το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β, γεγονός πολύ δραματικό, για να αποδοθεί σε έμμεση αλληλεπίδραση.

Η υπόθεση ότι ο παράγοντας NF-κB είναι σημαντικός για την καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β, ενισχύεται, επίσης, από το γεγονός ότι η μεταλλαγμένη LMP1ΔC που στερείται των περιοχών ενεργοποίησης του NF-κB, δεν αναστέλλει το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β. Από την Εικόνα 10 και την Εικόνα 12 προκύπτει το συμπέρασμα ότι, οι σημειακές μεταλλάξεις που μελετήθηκαν επιφέρουν μικρή απώλεια στη δραστηριότητα της LMP1 πρωτεΐνης. Έτσι, οι LMP1AAA και LMP1Y384G διατηρούν την ικανότητα να επάγουν ενεργοποίηση του NF-κB και να καταστέλλουν την μετάδοση σήματος από τον TGF-β. Την ίδια ικανότητα φαίνεται να διατηρεί και η μεταλλαγμένη LMP1(1-231), πιθανότατα μέσω της CTAR1 περιοχής, όπως προκύπτει και από πειράματα σε λεμφοκύτταρα. Η μεταλλαγμένη LMP1Δ188-351 που στερείται της CTAR1 και της περιοχής σύνδεσης των CTAR1 και CTAR2, ενώ περιέχει την CTAR2, εμφανίζει μειωμένη δραστηριότητα τόσο στην καταστολή του μονοπατιού του TGF-β, όσο και στην ενεργοποίηση του NF-κB. Φαίνεται ότι στα COS-7 κύτταρα, η περιοχή CTAR1 είναι πιο σημαντική από την CTAR2 για τη δραστηριότητα της LMP1, σε αντίθεση με τα Β-λεμφοκύτταρα. Τέλος, είναι φανερό ότι η LMP1D1, που στερείται των τεσσάρων

πρώτων διαμεμβρανικών περιοχών, όντας ανίκανη να συναθροιστεί στην πλασματική μεμβράνη των COS-7 κυττάρων, δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, και, συνεπώς, δεν μπορεί να καταστείλλει την σηματοδότηση από τον TGF-β. Επομένως, η δυνατότητα συνάθροισης των μορίων της LMP1, είναι σημαντική για την επαγωγή της δράσης της τόσο στα COS-7 κύτταρα όσο και στα Β-λεμφοκύτταρα.

### **Δράση των μεταγωγέων του NF-κB, και των αρνητικώς επικρατούντων μορφών του, στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β.**

Όπως υποδεικνύουν τα αποτελέσματα της Εικόνας 14, οι ενδιάμεσες πρωτεΐνες του μονοπατιού ενεργοποίησης του NF-κB, που χαρακτηρίζονται ως μεταγωγείς του, TRAF2, NIK, και IKKβΔ9, απενεργοποιούν δραστικά την μεταγραφική ενεργότητα των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4, όταν υπερεκφράζονται στα κύτταρα COS-7, ακόμα και όταν η πρωτεΐνη LMP1 εκφράζεται σε χαμηλές ποσότητες. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια ακόμα ενδειξη του ρόλου που φαίνεται να διαδραματίζει ο παράγοντας NF-κB στην καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης του TGF-β. Η μειωμένη ενεργότητα των Smad πρωτεϊνών θα μπορούσε να οφείλεται σε μείωση της έκφρασης των τελευταίων, είτε από τους μεταγωγείς, είτε από την ενεργοποίηση και συνέκφραση κάποιων κινασών που θα μπορούσαν να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες Smad και να επάγουν την αποικοδόμησή τους, μέσω μηχανισμών ουμπικιτινίωσης. Η έκφραση, ωστόσο, των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4 παραμένει ανεπηρέαστη, όπως φαίνεται στην Εικόνα 15.

Τα αποτελέσματα της Εικόνας 16B υποδηλώνουν ότι οι μεταγωγείς TRAF2 και IKKβΔ9 του μονοπατιού ενεργοποίησης του NF-κβ, ακόμα και παρουσία υψηλής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης LMP1, αφ' ενός καταστέλλουν την ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών, αφ' ετέρου ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν ότι ο NF-κB ευθύνεται για την επίδραση της πρωτεΐνης LMP1 στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β. Υπάρχει βεβαίως το ενδεχόμενο, η κινάση IKKβ να φωσφολυλιώνει μια άγνωστη πρωτεΐνη που δεν σχετίζεται με την πρωτεΐνη IκB.

Στην Εικόνα 22 φαίνεται η επίδραση των αρνητικώς επικρατούντων μορφών των μεταγωγέων του NF-κB στην μεταγραφική ενεργότητα των πρωτεϊνών Smad.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μορφές αυτές των επαγωγέων του NF-κB, δεν κατόρθωσαν να αναστείλλουν την καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης του TGF, ενώ ανέστειλαν αποτελεσματικά την ενεργοποίηση του NF-κB. Το γεγονός αυτό, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οδηγεί στην υπόθεση ότι η πρωτεΐνη LMP1 εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιεί ένα άλλο μονοπάτι για την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας των Smad πρωτεϊνών, δηλαδή για την καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των πειραμάτων με τη χρήση μεταλλαγμένων μορφών των επαγωγέων σηματοδότησης του NF-κB (Εικόνα 23), έδειξαν ότι οι μεταλλαγμένες αυτές μορφές, παρουσία του TGF-β προκαλούν ισχυρότερη σηματοδότηση από τον παράγοντα αυτό. Έτσι, ανεξάρτητα από την πιθανή ύπαρξη και εναλλακτικού μονοπατιού, το μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην καταστολή της μετάδοσης του σήματος του μετασχηματίζοντος αυξητικού παράγοντα TGF-β, σε COS-7 κύτταρα.

### **Ο NF-κB παράγοντας απενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β.**

Τα διμερή που σχηματίζει η πρωτεΐνη p65 (NF-κB) μειώνουν δραστικά την μεταγραφική ενεργότητα των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών, όπως υποδεικνύουν τα αποτελέσματα της Εικόνας 17. Το γεγονός ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p65ΔC, που στερείται της καρβοξυτελικής περιοχής η οποία επάγει την μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB, δεν καταστέλλει το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β, επιβεβαιώνει τον ρόλο του παράγοντα αυτού στην προαναφερθείσα καταστολή. Η καρβοξυτελική περιοχή της p65, ίσως είναι η περιοχή με την οποία αλληλεπιδρά με την Smad3 πρωτεΐνη για να καταστείλει την μεταγραφική της ενεργότητα, οπότε η έλλειψή της οδηγεί στην μεταγωγή του σήματος από τον παράγοντα TGF-β. Ίσως πάλι η έλλειψη της περιοχής αυτής, με την οποία έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά η p65 με τον παράγοντα p300/CBP, να αναστέλλει την ενεργοποίηση, μέσω της p300/CBP, της πρωτεΐνης Smad7, και με αυτόν τον έμμεσο τρόπο, να επιτρέπεται η μεταγωγή του σήματος του TGF-β. Η αγρίου τύπου p65 μπορεί να αναστέλλει τη σηματοδότηση του TGF-β, με τον ίδιο έμμεσο μηχανισμό, δηλαδή μέσω της ενεργοποίησης, με την βοήθεια του συμπλόκου p300/CBP, της ανασταλτικής πρωτεΐνης Smad7. Οι παραπάνω υποθέσεις ενισχύονται από την παρατήρηση ότι, η πρωτεΐνη p50 δεν επιδρά στο μονοπάτι του TGF-β, καθώς και από το ότι η υβριδική πρωτεΐνη p50/65

επιδρά στο ίδιο μονοπάτι περισσότερο από την p50. Προφανώς, η καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης p65 είναι σημαντική για την άμεση ή έμμεση καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β. Τα προαναφερθέντα συμπεράσματα ενισχύονται και από τα αποτελέσματα της Εικόνας 18, όπου καταδεικνύεται η ανασταλτική δράση της p65 στην μεταγραφική ενεργότητα των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4, αλλά και η δραστηριότητά της στην ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή 3xKBL. Η προαναφερθείσα αναστολή, δεν οφείλεται στην μείωση της έκφρασης ή στην αποικοδόμηση των Smad πρωτεϊνών λόγω της υπερέκφρασης της p65, όπως αποδεικνύεται από την Εικόνα 19.

Το γεγονός ότι η *in vitro* ανάλυση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Smad3 και p65 (εικόνα 20), δεν έδωσε σαφή αποτελέσματα, μπορεί να οφείλεται στην απαίτηση, η Smad3 πρωτεΐνη να είναι φωσφορυλιωμένη για να αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη p65. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε *in vivo* μελέτη της αλληλεπίδρασης αυτής, όπως φαίνεται στην Εικόνα 21. Η μικρής έντασης αλληλεπίδραση μεταξύ των συνεκφραζόμενων Smad3 και p65, (παρουσία του CA-ALK5, που ενεργοποιεί την Smad3), θα μπορούσε να οφείλεται στον διαφορετικό εντοπισμό των δύο αυτών πρωτεϊνών. Είναι πιθανό, η Smad3 πρωτεΐνη μετά την φωσφορυλίωσή της από τον υποδοχέα CA-ALK5, να μεταβαίνει στον πυρήνα, ενώ η p65 θα πρέπει ίσως πρώτα να ενεργοποιηθεί για να μεταβεί στον πυρήνα, είτε με την συνεπιμόλυνση των κυττάρων με την πρωτεΐνη LMP1, είτε με την επώαση των κυττάρων με τον παράγοντα TNFα.

### **Δομική και λειτουργική ανάλυση της πρωτεΐνης Smad3.**

Η αγρίου τύπου πρωτεΐνη Smad3 περιέχει τις λειτουργικές περιοχές MH1 και MH2, καθώς και την περιοχή σύνδεσής τους. Στο αμινοτερματικό άκρο υπάρχει η αλληλουχία K<sup>40</sup>KLKK<sup>44</sup> που αποτελεί το σήμα πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης (NLS), ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο περιέχεται το μοτίβο SSxS που φωσφορυλιώνεται από τον υποδοχέα του TGF-β και οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Smad3, όπως έχει περιγραφεί στην Εισαγωγή. Η περιοχή MH1 ευθύνεται για την πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 στο DNA, ενώ η περιοχή MH2 για την ενεργότητά της στην μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων.



Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για την μελέτη των δομικών και λειτουργικών περιοχών της Smad3 πρωτεΐνης, κατασκευάστηκαν 8 πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης αυτής. Όλες οι ελλειμματικές μορφές της Smad3 φέρουν 6 αντίγραφα του επίτοπου myc στο αμινοτερματικό τους άκρο για εύκολο εντοπισμό τους. Κατά αρχήν ελέγχθηκε η έκφραση των ελλειμματικών μορφών σε κύτταρα COS-7. Πατατηρήθηκε μειωμένη έκφραση ορισμένων από αυτές τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες (Εικόνα 25), σε COS-7 κύτταρα, η οποία πιθανόν να μην οφείλεται στην ποιότητα των πλασμιδιακών φορέων τους, αλλά στην αποικοδόμησή τους, ίσως μέσω του μηχανισμού της ουμπικιτίνης. Το πρότυπο έκφρασης της Smad3(248-424) (Εικόνα 26), πιθανότατα οφείλεται σε πρωτεόλυση της πρωτεΐνης, λόγω της μορφολογικής της διαμόρφωσης.

Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα της Εικόνας 27, σε HepG2 κύτταρα, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Smad3 (1-374), καθώς στερείται μέρους της MH2 περιοχής και του μοτίβου SSxS, δεν επάγει μεταγραφική ενεργοποίηση, δεν φωσφορυλιώνεται από τον υποδοχέα του TGF-β, και συνεπώς έχει χαμηλή λειτουργικότητα στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β. Η Smad3 (1-290) πρωτεΐνη στερείται ακόμα μεγαλύτερης περιοχής της MH2 από ότι η Smad3 (1-374) και συνεπώς, όπως αναμενόταν, χαρακτηρίζεται από ακόμα μικρότερη δραστηριότητα. Η πρωτεΐνη Smad3 (1-248) στερείται ολόκληρης της περιοχής MH2, ενώ η πρωτεΐνη Smad3 (1-122) χαρακτηρίζεται από έλλειμμα και της MH2 και της περιοχής σύνδεσης των MH1 και MH2. Έτσι, και οι πρωτεΐνες αυτές δεν ενεργοποιούν μεταγραφικά την ρυθμιστική περιοχή CAGA όπου προσδένονται, όπως αναμενόταν. Η πρωτεΐνη Smad3 (122-424) χαρακτηρίζεται από έλλειμμα της περιοχής MH1, ενώ η πρωτεΐνη Smad3 (248-424) από έλλειμμα και της περιοχής MH1 και της περιοχής σύνδεσης. Οι πρωτεΐνες αυτές, καθώς δεν προσδένονται στις ρυθμιστικές τους περιοχές, δεν έχουν τη δυνατότητα μεταγραφικής ενεργοποίησής τους. Η πρωτεΐνη Smad3 (59-290), σε αντίθεση με τις προηγούμενες που είναι ελλειμματικές (truncated) είτε στο αμινοτερματικό είτε στο καρβόξυτελικό άκρο τους, είναι διπλά truncated καθώς στερείται του NLS της αμινοτερματικής περιοχής και του μεγαλύτερου μέρους της MH2 περιοχής. Η έλλειψη της τελευταίας, όπως ήταν αναμενόμενο, της στερεί σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Smad3 (59-424) δεν περιέχει την περιοχή όπου εντοπίζεται το NLS (αμινοξέα 40-44), ενώ περιέχει ακέραιες τις περιοχές πρόσδεσης στο DNA (MH1) και την περιοχή μεταγραφικής ενεργότητας (MH2). Έτσι, η πρωτεΐνη αυτή αναμενόταν να έχει μεταγραφική

δραστικότητα, που, ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη του σήματος NLS. Η έλλειψη αυτή, πιθανότατα, αποτρέπει την φωσφορυλίωσή της Smad3 πρωτεΐνης, την είσοδό της στον πυρήνα και συνεπώς την επαγωγή μεταγραφικής ενεργοποίησης. Ωστόσο, προηγούμενα πειράματα έχουν δώσει στοιχεία για την είσοδο στον πυρήνα ελλειμματικών πρωτεϊνών Smad3, που αποτελούνται μόνο από την περιοχή MH2. Επομένως, είναι πιθανόν, η έλλειψη ενεργότητας που χαρακτηρίζει την Smad3 (59-424), να οφείλεται στην πρόκληση αλλαγής στη διαμόρφωση του μορίου της πρωτεΐνης. Η αλλαγή αυτή θα μπορούσε, για παράδειγμα, να αναστέλλει τον σχηματισμό της β-hairpin και να αποτρέπει την πρόσδεση της μεταλλαγμένης Smad3 στην ρυθμιστική περιοχή της στο DNA. Ωστόσο, η ικανότητα πρόσδεσης, ή μη, στο DNA, τόσο αυτής της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης όσο και των προαναφερθέντων, θα πρέπει να εξεταστεί με πειράματα ηλεκτροφορητικής ικανότητας συμπλόκου (EMSA).

Η μικρή μεταγραφική ενεργότητα των προαναφερθέντων μεταλλαγμένων μορφών της Smad3, που παρατηρήθηκε, συγκριτικά με εκείνη της αγρίου τύπου Smad3, μπορεί να οφείλεται στην Smad4 πρωτεΐνη. Η τελευταία θα μπορούσε να σχηματίζει ενεργά μεταγραφικά ετερομερή με την ενδογενή αγρίου τύπου Smad3, και να προσδίδει μικρή αύξηση στην μεταγραφική δραστηριότητα του συνθετικού υποκινητή 12xCAGAluc.

Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Smad3 (1-290) είναι πιθανό να ανταγωνίζεται την αγρίου τύπου Smad3 πρωτεΐνη, για την πρόσδεση στις περιοχές ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, σε κύτταρα HepG2. Το συμπέρασμα αυτό, που προκύπτει από τα αποτελέσματα της Εικόνας 28, οδηγεί στην υπόθεση, ότι και οι άλλες μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 πρωτεΐνης που περιέχουν άθικτη την περιοχή MH1, μπορεί να προσδένονται στην αλληλουχία CAGA του DNA των ρυθμιστικών περιοχών τους, εμποδίζοντας την πρόσδεση της αγρίου τύπου Smad3 και συνεπώς την μεταγραφική ενεργοποίηση. Επιπροσθέτως, οι μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 που δεν έχουν την περιοχή MH2, όπως η Smad3 (1-290), μπορεί να προσδένονται στο DNA, αλλά δεν μπορούν να σχηματίσουν ετερομερή με την Smad4 και συνεπώς να προκαλέσουν μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων, που η έκφρασή τους ρυθμίζεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β. Τα παραπάνω θα πρέπει να επαληθευθούν και με πειράματα EMSA.

## Μελλοντικοί στόχοι.

Η μελέτη της δράσης της LMP1 πρωτεΐνης θα συνεχιστεί με τις ακόλουθες αναλύσεις:

- Επιμόλυνση κυττάρων COS-7 ή HEK293 με φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1 ή/και της Smad3 και ανίχνευση του εντοπισμού της τελευταίας (ανοσοφθορισμός) με χρήση αντισώματος anti-Smad3.
- Δοκιμασία της JNK κινάσης, η οποία ενεργοποιείται από την LMP1, ως εναλλακτικό μονοπάτι για την καταστολή του TGF-β μονοπατιού.
- Κατασκευή σημειακά μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης Smad3, και χρήση αυτών, καθώς και των προαναφερθέντων ελλειμματικών μορφών της Smad3 σε πειράματα:
  1. πρόσδεσης στο DNA (EMSA)
  2. πυρηνικού εντοπισμού (ανοσοφθορισμοί)
  3. αλληλεπίδρασης με μέλη της οικογένειας του NF-κB (p50, p52, p65) (pull down, Co-IP)
  4. αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη LMP1 και με κινάσες του μονοπατιού που χρησιμοποιεί η πρωτεΐνη αυτή, (NIK, MEKK1, IKKβ), καθώς είναι πιθανόν η Smad3 πρωτεΐνη να φωσφορυλιώνεται από κάποια κινάση του μονοπατιού αυτού (pull down, Co-IP)
- Χρήση αδενοϊών που φέρουν την NF-κB πρωτεΐνη, ή μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 πρωτεΐνης, για την μελέτη της καταστολής ενδογενών TGF-β μονοπατιών (*in vivo* πειράματα).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. MacEarland E.D.C., Kenneth M. Izumi and G. Mosialos, *Oncogene*, 1999, 18, 6959-6964
2. Mosialos G., M.Birkenbach, Ryalamanchili, T.Van Arsdale, C.Ware, and D.E. Kieff, *Cell*, 1995, Vol.80, 389-399.
3. Mosialos G., *seminars in CANCER BIOLOGY*, Vol. 8, 1997, 121-129.
4. Maniatis T., 1997, *Science*, 278, 818-819.
5. Shepard K.A., D.W.Rose, Z.K.Haque, R.Kurokawa, E.McInerney, S.Westin, D.Thanos, M.G.Rosenfeld, C.K.Glass, and T.Collins, *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 6367-6378.
6. Sylla B.S., S.C. Hung, D.M. Davidson, E. Hatzivassiliou, N.L. Malinin, D. Wallach, T.D. Gilmore, E.D. Kieff, and G. Mosialos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, Vol.: 95, 10106-10111.
7. Fennewald S., Van Santen V., and Kieff E., *J. Virology*, 1984, 51 ,411-419.
8. Izumi K.M., Kaye K.M., and Kieff ED., *J. Virology*, 1994, 68, 4369-4376.
9. Izumi K.M., K.M. Kaye, and E.D. Kieff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:1447-1452.
10. Izumi K.M., and E.D. Kieff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:12592-12597.
11. Kaye, K.M., K.M. Izumi, H. Li, E. Johannsen, D. Davidson, R. Longnecker, and E.D. Kieff, *Journal of Virology*, 1999, 10525-10530.
12. Devergne O., E.C. McFarland, G.Mosialos, K.M. Izumi, C.F. Ware, and E.D. Kieff, *Journal of Virology*, 1998, 72, 7900-7908.
13. Devergne O., E. Hatzivassiliou, K.M. Izumi, K.M. Kaye, M.F.Kleijnen, E.D. Kieff, and G. Mosialos, *Mol. Cell. Biol.*, 1996, 16: 7098-7108
14. Ting A.T., F. Pimentel-Muinos, and B. Seed, *EMBO J.*, 1996, 15: 6189-6196.
15. Izumi K.M., Cahir McFarland ED., Ting AT, Riley EA., Seed B., and Kieff ED., *Mol. Cell. Biol.*, 1999, 19, 5759-5767.
16. Izumi K.M., E.C.McFarland, E.A. Riley, D Rizzo, Y. Chen, and E.D. Kieff, *Journal of Virology*, 1999, 9908-9916.
17. Inman G.J., and M.J. Allday, *J. Gen. Virol.*, 2000, 81, 1567-1578.
18. Arvanitakis L., N.Yaseen, and S. Sharma, *J. Immunol.*, 1995, 155(3), 1047-1056.

19. Takanashi M., J. Li, M. Shirakata, S. Mori, and K. Hirai, *Arch. Virol.*, 1999, 144: 241-257
20. Abraham D.J., X. Shiwen, C.M. Black, S. Sa, Y. Xu, and A. Leask, *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, Vol. 275, No. 20, 15220-15225.
21. Lopez-Rovira T., E. Chalaux, J.L. Rosa, R. Bartrons, and F. Ventura, *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, Vol. 275, No. 37, 28937-28946.
22. Engel M.E., M.A. McDonnell, B.K. Law, and H.L. Moses, *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, Vol. 274, No. 52, 37413-37420.
23. Christian J.L. and T. Nakayama, *BioEssays* 21, 1999: 382-390.
24. Attisano L. and J.L. Wrana, *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, 12: 235-243.
25. Heldin C-H., K. Miyazono, and P. Dijke, *Nature*, 1997, 390: 465-471.
26. Massagué J., *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, 67: 753-791.
27. Derynck R., Zhang Y., Feng X-H, *Cell*, 1998, 95: 737-740
28. Zawel L., Dai J.L., Buckhaults P., Zhou S., Kinzler K.W., Vogelstein B., Kern S.E., *Mol. Cell*, 1998, 1: 611-617.
29. Shi Y., Wang Y-F., Jayaraman L., Yang H., Massagué J., Pavletich N.P., *Cell*, 1998, 94: 585-594.
30. Xiao Z., X. Liu, and H.F. Lodish, *The Journal of Biological Chemistry*
31. Shi Y., Hata A., Lo R.S., Massagué J., Pavletich N.P., *Nature*, 1997, 388: 87-93.
32. Kawabata M., Inoue H., Hanyu A., Imamura T., Miyazono K., *EMBO J.*, 1998, 17: 4056-4065.
33. Tsukazaki T., Chiang T.A., Davison A.F., Attisano L., Wrana J.L., *Cell*, 1998, 95: 779-791.
34. Lo R.S., Chen Y-G, Shi Y., Pavletich N.P., Massagué J., *EMBO J.*, 1998, 17: 996-1005.
35. Chen Y-G., Hata A., Lo R.S., Wotton D., Shi Y., Pavletich N., and Massagué J., *Genes and Development*, 1998, 12: 2144-2152.
36. Massagué J., and Wotton D., *EMBO J.*, 2000, Vol.:19, 1745-1754.
37. Kretschmar M., Doody J., Timokhina I., Massagué J., *Genes and Development*, 1999, 13: 804-816.
38. Heldin C-H., P. ten Dijke, *Nature Cell Biology*, 1999, Vol.1.

39. Lo R.S., Massague J., *Nat. Cell Biol.*, 1999, 1: 472-478.
40. Luo K., Stroschein S.L., Wang W., Chen D., Martens E., Zhou S., Zhou Q., *Genes and Development*, 1999, 13: 2196-2206.
41. Sun Y., Liu X., Ng-Eaton E., Lodish H.F., Weinberg R.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1999, 96: 12442-12447.
42. Liu F., Pouponnot C., and Massague J., *Genes and Denelopment*, 1997, 11: 3157-3167.
43. Moustakas A., and Kardassis D., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1998, Vol. 95, 6733-6738.
44. Liberati N.T., Datto M.B., Frederick J.P., Shen X., Wong C., Rougier-Chapman E.M., and Wang X-F., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1999, Vol. 96, 4844-4849.
45. Wong C., Rougier-Chapman E.M., Frederick J.P., Datto M.B., Liberati N.T., Li J-M., and Wang X-F., *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 1821-1830.
46. Yanagisawa J., Yanagi Y., Masuhiro Y., Suzawa M., Watanabe M., Kashiwagi K., Toriyabe T., Kawabata M., Miyazono K., and Kato S., *Science*, 1999, Vol.:283, 1317-1321.
47. Yanagi Y., Suzawa M., Kawabata M., Miyazono K., Yanagisawa J., and Kato S., *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.: 274, No. 19, 12971-12974.
48. Shen X., Hu P.P., Liberati N.T., Datto M.B., Frederick J.P., and Wang X-F., *Molecular Biology of the Cell*, 1998, Vol. 9, 3309-3319.
49. Dong C., Li Z., Goldschmidt-Clermont P.J., *Mol. Cell*, 2000, 5: 27-34.
50. Padgett R.W., Das P., and Krishna S., *BioEssays*, 1998, 20: 382-391.
51. Massague J., *Nature Cell Biology*, 1999, Vol.:1, E117-E119.
52. Ashcroft G., Yang X., Glick A., Weinstein M., Letterio J.J., Mizel D.E., Anzano M., Greenwell-Wild T., Wahl S.M., Deng C., and Roberts A.B., *Nature Cell Biology*, 1999, Vol.:1, 260-266.
53. Eliopoulos A.G. et al., *Journal of Virology*, 1999, 73: 1023-1035.
54. Floettmann and Rowe, *Oncogene*, 1999, 15: 1851-1858.
55. Liebowitz et al, *Journal of Virology*, 1992, 66: 4612-4616
56. Bitzer M., von Gersdorff G., Liang D., Dominguez-Rosales A., Beg A.A., Rojkind M., and Bottinger E.P., *Genes and Development*, 2000, 14(2): 187-197.

57. Gerritsen M.E., Williams A.J., Neish A.S., Moore S., Shi Y., Collins T., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1997, 94 (7): 2927-2932.
58. Nagarajan R.P., Chen F., Li W., Vig E., Harrington M.A., Nakshatri H., Chen Y., *Biochem J.*, 2000, 15;348, 591-596.